

Aus dem Institut für Experimentelle Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Direkter *ex vivo* Nachweis Myelin Basic Protein (MBP)- spezifischer T-Helferzellen bei Multiple Sklerose Patienten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Barbara Juliane Holzknecht
aus Ostfildern-Ruit

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
2. Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Krieg
3. Prof. Dr. med. Angela Gause

Datum der Einreichung: 1. August 2002

Datum der Promotion: 14. Juli 2003

Abstract

In der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) wird autoantigenspezifischen proinflammatorischen T-Helferzellen eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Das am meisten untersuchte Autoantigen ist das Myelin Basic Protein (MBP). Bisher waren zum Nachweis autoantigen-spezifischer T-Zellen deren Kultur über Tage bis Monate unumgänglich. In dieser Arbeit wurden Methoden zum direkten *ex vivo*-Nachweis autoreaktiver T-Helferzellen etabliert, die die reaktive Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor α nach sechsständiger Stimulation nachweisen. Die durchflusszytometrische Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen wies eine Sensitivität von 1×10^{-4} in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) auf. Es konnten damit bei 34 untersuchten MS-Patienten und 25 gesunden Kontrollpersonen keine MBP-reaktiven T-Helferzellen detektiert werden, während sich die Reaktion auf die beiden Kontrollantigene Tetanus Toxoid und Cytomegalie Virus-Antigen in den beiden Gruppen nicht relevant unterschied. Deshalb wurde in einer anderen Methode reaktiv sezerniertes Zytokin extrazellulär auf lebenden Zellen gebunden und durch einen anschließenden magnetischen Anreicherungsschritt die Sensitivität auf 2×10^{-5} erhöht. Bei einem von acht MS-Patienten wurde so eine Population MBP-spezifischer Zellen mit einer Ausgangsfrequenz von $2,15 \times 10^{-5}$ nachgewiesen. Im Liquor von drei MS-Patienten ließen sich keine MBP-reaktiven proinflammatorischen T-Helferzellen detektieren. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Frequenz MBP-spezifischer T-Helferzellen im peripheren Blut und im Liquor der meisten MS-Patienten und Kontrollpersonen geringer ist als die Sensitivität der etablierten Methoden, diese Zellen jedoch bei einigen Patienten in höheren Frequenzen nachgewiesen werden können.

Autoimmunität
Basisches Myelinprotein
Multiple Sklerose
Th1-Zellen
Zytokine

Abstract

Autoantigen-specific proinflammatory T-helper cells are assumed to play an important role in the pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS). The most extensively studied autoantigen is Myelin Basic Protein (MBP). To detect autoantigen-specific T-cells, so far these had to be cultured for several days or months. In this work methods for the direct *ex vivo* detection of autoreactive T-helper cells have been established by detecting the reactive secretion of the proinflammatory cytokines Interferon γ and Tumor Necrosis Factor α after six hour stimulation. The flow cytometric analysis of antigen-reactive cytokine expression in fixed cells showed a sensitivity of 1×10^{-4} in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). With this method there could not be detected any MBP-reactive T-helper cells in 34 MS-patients and 25 healthy controls, whereas the reaction after stimulation with the two control antigens Tetanus Toxoid and Cytomegalovirus antigen did not differ relevantly between the two groups. Therefore in another method the reactively secreted cytokine was bound on the surface of living cells and the sensitivity was then increased to 2×10^{-5} by following magnetic enrichment. With that, there could be detected a population of MBP-specific cells in one of eight MS-patients with a frequency of $2,15 \times 10^{-5}$ in PBMC. There could not be found any MBP-reactive proinflammatory T-helper cells in the cerebrospinal fluid of three MS-patients. Our results suggest that the frequency of MBP-specific T-helper cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is below the employed methods' detection limit in most MS-patients, but seldom these cells can be detected in higher frequencies.

Autoimmunity

Cytokines

Multiple Sclerosis

Myelin Basic Protein

Th1-cells

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Immunologische Grundlagen	1
1.1.1 Funktionelle Einteilung des Immunsystems:	
Unspezifische und spezifische, zelluläre und humorale Faktoren	1
1.1.2 Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigene	2
1.1.3 Zwei Untergruppen von T-Helferzellen und deren klinische Relevanz	3
1.2 Multiple Sklerose: eine T-zellvermittelte Autoimmunerkrankung?	3
1.2.1 Klinische Charakteristika	3
1.2.2 Hinweise aus epidemiologischen Untersuchungen	4
1.2.3 Indizien für eine Autoimmungenese der Multiplen Sklerose	5
1.2.4 Die Pathogenese der MS ist multifaktoriell – viele zelluläre und humorale Faktoren sind beteiligt.	7
1.3 Myelin Basic Protein (MBP) als mögliches Autoantigen - Stand der Forschung.....	9
1.4 Die Detektion antigenspezifischer T-Zellen	11
2 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	16
3 MATERIALIEN UND METHODEN	17
3.1 Lösungen und Geräte.....	17
3.1.1 Puffer und Medien	17
3.1.2 Einmal-Gefäße und Geräte	17
3.2 Zellpräparation.....	18
3.2.1 Gewinnung von peripherenvenösem Blut	18
3.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)	18

3.2.3 Gewinnung von Liquorzellen	18
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl	18
3.3 Fluoreszenz als Stoffeigenschaft und deren methodische Nutzung	19
3.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe	19
3.3.2 Kopplung von Fluorochromen an Proteine	20
3.3.3 Immunfluoreszenz	21
3.4 <i>in vitro</i>-Stimulation humaner Zellen.....	22
3.4.1 Stimulationsbedingungen und -zeiten	22
3.4.2 Kostimulation mit α CD28-Antikörpern	22
3.4.3 Verwendete Antigene	23
3.4.4 Stimulation einer T-Zelllinie bzw. Stimulation von Liquorzellen	24
3.4.5 Zugabe von Brefeldin A für die intrazelluläre Zytokinfärbung	24
3.5 Fixierung und intrazelluläre Färbung von Zytokinen	24
3.5.1 Ablösen der Zellen mit EDTA	24
3.5.2 Lysierung, Fixierung und Permeabilisierung von Vollblut	25
3.5.3 Fixierung und Permeabilisierung von PBMC	25
3.5.4 Extra- und intrazelluläre Färbung von fixierten und permeabilisierten Zellen	25
3.6 Technologie der zellulären Affinitätsmatrix: IFNγ-Sekretionsassay.....	26
3.7 Magnetische Zellseparation.....	26
3.8 Durchflußzytometrie	28
3.9 Auswertung der durchflußzytometrisch erhaltenen Daten.....	30
3.10 Statistische Auswertung.....	30
4 ERGEBNISSE	31
4.1 Etablierung der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung.....	31
4.1.1 Vergleich der Vollblutstimulation mit der Stimulation von PBMC	31
4.1.2 „Intra Assay Variabilität“	32

4.1.3	Definition des „Cut-off point“	33
4.1.4	Verlaufsanalyse der antigenspezifischen Zytokinantwort	34
4.2	Etablierung des IFNγ-Sekretionsassays.....	36
4.2.1	Kinetik des IFN γ -Sekretionsassays	36
4.2.2	Bestimmung der Rückgewinnungsrate	39
4.2.3	Berechnung des Stimulationsindex	40
4.3	Bestimmung der Sensitivität der verwendeten Methoden.....	40
4.3.1	Sensitivität der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen nach sechsstündiger Antigenstimulation	41
4.3.2	Sensitivität des IFN γ -Sekretionsassays mit nachfolgender magnetischer Anreicherung	43
4.4	Nachweis der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von MBP durch antigenpräsentierende Zellen (APC)	44
4.4.1	Aufnahme von FITC-markiertem MBP durch APC	44
4.4.2	Restimulation einer MBP-spezifischen T-Zelllinie	45
4.4.3	Bestimmung der optimalen Stimulationskonzentration von MBP	46
4.5	Vergleich der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten T- Helferzellen bei gesunden Probanden und MS-Patienten	47
4.5.1	Untersuchte gesunde Probanden	48
4.5.2	Untersuchte MS-Patienten	50
4.5.3	Statistischer Vergleich der antigenspezifischen T-Helferzellantwort auf verschiedene Antigene bei Gesunden und MS-Patienten	53
4.6	Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen mit dem IFNγ-Sekretionsassay	54
4.6.1	Untersuchte MS-Patienten	54
4.6.2	Nachweis geringer Frequenzen MBP-spezifischer T-Helferzellen	55
4.7	Untersuchung von Liquorzellen.....	59
5	DISKUSSION	61

5.1	Optimierung der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung.....	61
5.2	Der IFNγ-Sekretionsassay zum Nachweis lebender antigenspezifischer T-Helferzellen	63
5.3	Sensitivität der verwendeten Methoden	64
5.3.1	Theoretischer Hintergrund	64
5.3.2	Bestimmung der Sensitivität mit Hilfe einer Verdünnungsreihe	66
5.4	Das Autoantigen MBP kann von APC des peripheren Blutes aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden.	67
5.5	Analyse IFNγ- und TNFα-exprimierender T-Helferzellen nach Stimulation mit einem Impf- und einem viralen Kontrollantigen	68
5.5.1	Die T-Helferzellantwort auf die Antigene TT und CMV unterscheidet sich nicht zwischen MS-Patienten und Gesunden.	68
5.5.2	Klinische Untergruppen der MS-Patienten weisen tendenzielle Unterschiede in der antigenspezifischen T-Helferzellantwort auf.	68
5.6	MBP-spezifische Th1-Zellen lassen sich im peripheren Blut nicht oder nur in sehr geringen Frequenzen nachweisen.	69
5.7	Auch im Liquor von MS-Patienten sind keine MBP-spezifischen Th1-Zellen nachweisbar.	71
5.8	Ausblick.....	73
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	75
	LITERATURVERZEICHNIS	76
	DANKSAGUNG	87
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	88

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalie Virus Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
HLA	Humane Leukozyten Antigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDA	Limiting Dilution Assay
Lf	Limes flocculation
MACS	Magnetische Zellsortierung
MBP	Myelin Basic Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-BSA	PBS mit Rinderserum-Albumin
PBS-BSA-Azid	PBS-BSA mit Natriumazid

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPMS	Primär Progrediente Multiple Sklerose
RRMS	Rezidivierend Remittierende Multiple Sklerose
SD	Standardabweichung
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SI	Stimulationsindex
SPMS	Sekundär Progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TT	Tetanus Toxoid
VC	Variabilitätskoeffizient
\bar{x}	Arithmetischer Mittelwert
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Funktionelle Einteilung des Immunsystems:

Unspezifische und spezifische, zelluläre und humorale Faktoren

Das Immunsystem hat sich im Laufe der Evolution als körpereigene Abwehr gegen Mikroorganismen, Fremdstoffe und maligne Zellen entwickelt. Dieser Schutz ist hochspezifisch für die verschiedenen abzuwehrenden Strukturen.

Wichtige Organe des Immunsystems sind die primären lymphatischen Organe Thymus und Knochenmark sowie die sekundären lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe. Auf zellulärer Ebene wird die Immunantwort vor allem von Leukozyten getragen, die nicht nur in den lymphatischen Organen zirkulieren, sondern fast alle Organe des menschlichen Körpers erreichen. Auf der Zelloberfläche von Leukozyten befinden sich Differenzierungsantigene, die sogenannten „cluster of differentiation“ (CD-Antigene). Mit Hilfe dieser Oberflächenmarker, die durch monoklonale Antikörper identifiziert werden können, lassen sich die verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen differenzieren.

Man unterscheidet das angeborene, unspezifische Immunsystem von der erworbenen, spezifischen Abwehr, wobei diese beiden funktionellen Einheiten synergistisch zusammenarbeiten.

Die angeborene Immunantwort wird als unspezifisches Immunsystem bezeichnet, da sie zunächst unabhängig vom abzuwehrenden Erreger agiert. Neben physikalischen und chemischen Barrieren wie z.B. dem Säureschutzmantel der Haut, besteht dieses System aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Die humorale Ebene wird vom Komplementsystem und anderen löslichen Faktoren wie z.B. Lysozym, Interferonen und Akutphaseproteinen gebildet. Die zelluläre Komponente besteht aus dem Monozyten-Makrophagensystem, Granulozyten und Natürlichen Killerzellen, die zudem ein Bindeglied zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem darstellen.

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Antigene bei mehrfachen Kontakten wiederzuerkennen und dadurch schneller und effektiver bekämpfen zu können.

T- und B-Lymphozyten bilden die zelluläre Grundlage dieses Systems und können mit ihren Antigenrezeptoren hochspezifisch bestimmte Strukturen erkennen. Die Basis dieser Vielfalt bildet das sogenannte „Genrearrangement“: Die genetische Information zur Bildung der Antigenrezeptoren ist auf mehrere Genabschnitte verteilt, die jeweils in vielen verschiedenen Varianten vorliegen. Während der Zellreifung wird das Gen dann durch Verknüpfung je einer Variante der verschiedenen Genabschnitte zusammengefügt. Nach Antigenkontakt können B- und T-Zellen klonal expandieren und so ein immunologisches Gedächtnis ausbilden.

B-Lymphozyten stellen die humorale Komponente dieses spezifischen Immunsystems dar, sie bilden und sezernieren antigenspezifische Immunglobuline (Antikörper) verschiedener Isotypen. Die zelluläre spezifische Immunantwort wird von T-Lymphozyten getragen, deren gemeinsames Merkmal die Expression von Proteinen des CD3-Komplex ist. Dieser beinhaltet unter anderem den Antigenrezeptor, der die Spezifität der T-Zellen ausmacht. T-Zellen erkennen mit Hilfe dieses T-Zellrezeptors (TCR) Fremdanigene, wenn diese von antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach Internalisierung und Prozessierung als Peptidfragmente in Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen präsentiert werden.

1.1.2 Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigene

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von T-Zellen: CD8⁺-Zellen erkennen Antigenpeptide in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Sie bilden in erster Linie eine Abwehr gegen virusinfizierte und maligne entartete Zellen. Die Abwehr bakterieller Antigene wird hauptsächlich durch CD4⁺-Zellen (T-Helferzellen) gewährleistet, die Antigenpeptide erkennen, die in MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden.

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch Bindung des TCR an ein MHC-Molekül und das darin präsentierte Antigenpeptid. Dieser trimolekulare Komplex allein ist jedoch nicht ausreichend, um die T-Zelle zu aktivieren. Neben dem CD4- bzw. CD8-Molekül, das die Bindung verstärkt, sind weitere kostimulatorische Signale durch Adhäsions- und akzessorische Moleküle notwendig. Das wichtigste dieser kostimulatorischen Signale ist die Bindung des T-Zelloberflächenmoleküls CD28 an die membranständigen Rezeptoren B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) der professionellen antigenpräsentierenden Zellen Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen. Die Signaltransduktion der T-Zellaktivierung wird durch Enzyme, die mit der intrazellulären Domäne des TCR und anderen Molekülen assoziiert sind, initiiert. Sie führt schließlich zur Genaktivierung und Transkriptionsregulation im Zellkern. Daraus folgt unter anderem die

verstärkte Expression von Kernbindungsproteinen, Aktivierungsantigenen und Zytokinen. Die Sekretion des Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) führt daraufhin zur klonalen Expansion antigenspezifischer T-Zellen.

1.1.3 Zwei Untergruppen von T-Helferzellen und deren klinische Relevanz

T-Helferzellen werden anhand der von ihnen sezernierten Zytokine in die funktionellen Untergruppen Th1 und Th2 unterteilt. Diese Unterscheidung wurde zunächst an T-Zellklonen im murinen System beschrieben (Mosmann et al., 1986) und später auf humane CD4⁺-Zellen übertragen (Romagnani, 1991). Th1-Zellen zeichnen sich durch Sekretion des Zytokins Interferon- γ (IFN γ) aus und führen zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen. Th2-Zellen sezernieren überwiegend Interleukin-4 (IL4) und regen B-Zellen zur Bildung von Antikörpern an. Einfluß auf die Differenzierung einer gemeinsamen Vorläuferzelle in Richtung Th1 oder Th2 haben verschiedene Faktoren wie das Zytokinmilieu, die Antigenkonzentration und die Art und Weise der Kostimulation (Abbas et al., 1996). Die Unterteilung menschlicher T-Helferzellen in die Subpopulationen Th1 und Th2 ist jedoch nicht als strikte Trennung in zwei Populationen zu verstehen. Th1- und Th2-Zellen stellen vielmehr Extremwerte einer Vielzahl von Populationen mit fließenden Übergängen dar (Kelso, 1995; Prussin, 1997).

Bei bestimmten Krankheitsgruppen lassen sich charakteristische Zytokinmuster nachweisen, die Hinweise auf ein Überwiegen einer der beiden Subpopulationen geben (O'Shea, 2002). Während ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Th2-Zellen bei atopischen Erkrankungen (Maggi et al., 1991) gefunden wurde, wird ein Überwiegen der proinflammatorischen Th1-Antwort für die Pathogenese einiger, überwiegend organspezifischer Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht (van der Graaff et al., 1998; Singh et al., 1999; Morahan et al., 2001).

1.2 Multiple Sklerose:

eine T-zellvermittelte Autoimmunerkrankung?

1.2.1 Klinische Charakteristika

Die Bezeichnung Multiple Sklerose (MS) und ihr Synonym Encephalomyelitis disseminata beschreiben die wichtigsten Charakteristika dieser Krankheit: MS ist eine inflammatorische Entmarkungserkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die mit einer Bindegewebsvermehrung einhergeht. Die Krankheit tritt sowohl zeitlich als auch örtlich disseminiert auf, d.h. sie verläuft in den meisten Fällen schubförmig und manifestiert sich in einer multifokalen Symptomatik.

Die Markscheiden (Myelinscheiden) der Nervenzellfortsätze (Axone) werden im ZNS von Oligodendrozyten gebildet und gewährleisten eine hohe Leitgeschwindigkeit der elektrischen Potentiale. Die Symptomatik der MS wird bei intaktem Axon vermutlich durch eine herabgesetzte Nervenleitgeschwindigkeit hervorgerufen, die Folge der Entmarkung (Demyelinisierung) ist.

Die Diagnose der MS wird anhand der Anamnese, der klinisch neurologischen Untersuchung, paraklinisch nachgewiesener Läsionen und des Liquorbefundes gestellt. Je nach der Anzahl der räumlich und zeitlich disseminiert nachgewiesenen Entmarkungsherde unterscheidet man die Bezeichnungen „sichere“ und „wahrscheinliche“ MS (Poser et al., 1983; Poser et al., 2001). Neben der am häufigsten vorkommenden schubförmigen Verlaufsform (Rezidivierend Remittierende MS (RRMS)) gibt es chronisch verlaufende MS-Formen. Geht eine RRMS in einen sich chronisch verschlechternden Zustand über, spricht man von Sekundär Progredienter MS (SPMS), während die von Beginn an chronisch verlaufende Form als Primär Progrediente MS (PPMS) bezeichnet wird.

1.2.2 Hinweise aus epidemiologischen Untersuchungen

Das Manifestationsalter der MS liegt meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr; Frauen sind ungefähr doppelt so häufig betroffen wie Männer.

MS gehört zu den epidemiologisch meist untersuchtesten Erkrankungen (Weinshenker, 1996). Aus diesen Studien ergeben sich Hinweise auf eine genetische Anfälligkeit für MS. Verwandte von MS-Patienten zeigen ein erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken. Zwillingsuntersuchungen haben gezeigt, dass eineiige Zwillinge mit einer Konkordanzrate von ca. 30% eine ungefähr siebenfach höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit haben als zweieiige Zwillinge (Sadovnik et al., 1993). Ebenso weisen verschiedene ethnische Gruppen unterschiedliche Prävalenzen auf (Ebers et al., 1994).

Daneben gibt es Anhaltspunkte für die Beteiligung eines Umweltfaktors. So ist die starke Differenz der Prävalenzen in Abhängigkeit der geographischen Lage auffällig: Um den Äquator beträgt sie 1:100 000, in Nordeuropa und -amerika 50:100 000. Migrationsstudien zeigten, dass das Risiko, an MS zu erkranken, vom Aufenthaltsort bis zum 15. Lebensjahr abhängig ist. Erwachsene Auswanderer tragen das Erkrankungsrisiko des Ortes, an dem sie bis zur Pubertät

aufgewachsen sind (Alter et al., 1966). Dies spricht für die Existenz eines Umweltfaktors, der schon in der Kindheit Einfluss auf das spätere Erkrankungsrisiko nimmt.

1.2.3 Indizien für eine Autoimmungenese der Multiplen Sklerose

Autoimmunerkrankungen sind Krankheiten, in denen das Immunsystem körpereigene Strukturen nicht als „Selbst“ erkennt und sie daher als „Fremd“ bekämpft. Selektionsmechanismen während der T-Zellreifung im Thymus verhindern normalerweise das Übertreten autoreaktiver T-Zellen in die Peripherie, es entsteht die sogenannte zentrale Toleranz. Auch nach der T-Zellreifung gibt es Mechanismen, die potentielle selbstreaktive Zellen „ausmustern“ – diese Vorgänge bilden die periphere Toleranz.

Es gibt im wesentlichen drei Hinweise, die für eine Autoimmungenese der MS sprechen: erstens die im Tiermodell gezeigte T-zellvermittelte Pathogenese, zweitens die Assoziation der MS mit bestimmten HLA-Typen und schließlich der Erfolg immunmodulatorischer Therapien bei MS.

Im Tiermodell lässt sich durch Übertragung autoreaktiver T-Helferzellen ein der MS ähnliches Krankheitsbild induzieren.

In Nagetieren und auch Primaten kann durch Injektion von Hirnhomogenat, gereinigten Myelin-komponenten oder deren immundominanten Peptiden Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), ein der MS ähnliches Krankheitsbild, induziert werden (Wekerle, 1993). Aktivierte T-Zellen eines solchen immunisierten Tieres wiederum können die Erkrankung auf gesunde Tiere übertragen (Ben-Nun et al., 1981; Pettinelli et al., 1981) - ein Hinweis auf die T-Zell-vermittelte Pathogenese dieser Erkrankung.

Keines der EAE-Modelle stellt jedoch alle klinischen und immunologischen Aspekte der Krankheit MS dar. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit EAE als Modell der humanen Demyelinisierungserkrankung eingesetzt werden kann. Vielmehr erscheint es angemessen zu fragen, welches der verschiedenen EAE-Modelle als Erklärung für welchen Aspekt der in sich sehr heterogenen Krankheit MS dienen kann (Wekerle et al., 1994; Petry et al., 2000).

Multiple Sklerose ist mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert.

Das Humane Leukozyten Antigen (HLA)-System (= Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-System) ist ein komplexes, kodominant vererbtes System von Gewebeantigenen. Es zeichnet sich durch einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus aus, d.h. es existiert eine Vielzahl verschiedener HLA-Phänotypen. Bestimmte HLA-Konstellationen gehen mit einer erhöhten Krankheitsempfänglichkeit für gewisse Autoimmunkrankheiten einher. Vom HLA-Phänotyp ist

abhängig, welches Peptid eines Proteins von APC präsentiert wird und die dafür spezifischen T-Helferzellen aktiviert. So ist es vorstellbar, dass nur bei einem bestimmten HLA-Typ (bei der MS z.B. HLA-DR2) autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, weil sie das präsentierte Peptid erkennen, während bei einem anderen HLA-Typ (hier: HLA-DRx) ein Peptid präsentiert wird, das nicht von eigenen T-Zellen erkannt wird (Abb. 1-1).

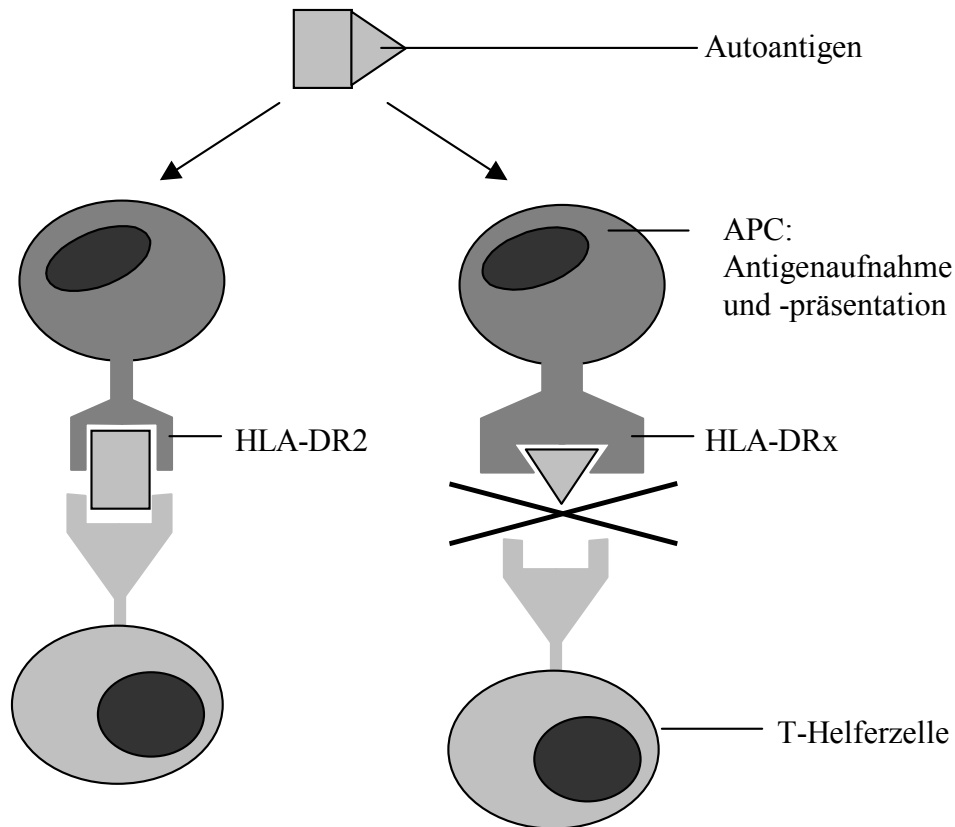


Abbildung.1-1: Bedeutung des HLA-Typs für die Peptidpräsentation von Autoantigenen. Individuen unterschiedlichen HLA-Typs präsentieren verschiedene Peptide des Autoantigens. Eine spezifische T-Zelle erkennt in diesem Fall nur das im Kontext von HLA-DR2 präsentierte Peptid, während das von einem anderen HLA-Typ (HLA-DRx) präsentierte Peptid nicht erkannt wird.

MS ist assoziiert mit dem DR2-Allel des HLA-Klasse-II-Antigens. Das Allel findet sich bei 55% der MS-Patienten im Vergleich zu nur 28% bei Gesunden (Sherrit et al., 1992).

In der Therapie der Multiplen Sklerose kommen immunmodulatorische Medikamente zum Einsatz.

Der Erfolg immunmodulatorischer Therapien spricht dafür, dass eine pathogene Immunantwort für das Entstehen der MS eine Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass hochdosierte Kortikosteroide in der Therapie des akuten MS-Schubes eine schnellere Remission erreichen (Miller et al., 2000). IFN β -Therapie bewies dagegen ein Herabsetzen der Schubfrequenz und wird als

Langzeittherapie eingesetzt (The IFN β Multiple Sclerosis Study Group, 1993). Das Immunsuppressivum Azathioprin zeigte ebenfalls eine Wirksamkeit in Form einer niedrigeren Schubfrequenz (Yudkin et al., 1991; Palace et al., 1997).

1.2.4 Die Pathogenese der MS ist multifaktoriell –

viele zelluläre und humorale Faktoren sind beteiligt.

Die Pathogenese der MS ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Bisher ist keine spezifische Immunantwort gegen ein oder mehrere Autoantigene eindeutig als Ursache für die Entstehung dieser Krankheit identifiziert worden. Vielmehr handelt es sich nach dem derzeitigen Stand der Forschung um Pathomechanismen, an denen eine Vielzahl zellulärer und humoraler Faktoren beteiligt sind (Hohlfeld et al., 1995; Martin et al., 1998; Stinissen et al., 1998; Martino et al., 1999). Als Autoantigene werden Myelinkomponenten, aber auch andere Strukturen wie zum Beispiel Hitzeschockproteine diskutiert (Schmidt, 1999).

Histologische Charakterisierung der MS-Läsionen im ZNS

Aufschluss über die an der Pathogenese beteiligten Faktoren geben zunächst histopathologische Untersuchungen der ZNS-Entmarkungsherde aus Autopsie- und Biopsie-Material. MS-Läsionen zeichnen sich durch drei Merkmale aus: Entzündung, Demyelinisierung und gliale Narbenbildung. Die nähere Untersuchung der Läsionen spricht für eine T-Zell-dominierte Pathogenese der entzündlichen Demyelinisierung mit zusätzlicher Beteiligung von Antikörpern. Neben einer perivaskulären Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen finden sich allgemeine Entzündungszeichen. So konnte eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen (Dore-Duffy et al., 1993), MHC-Molekülen (Traugott, 1987; Dore-Duffy et al., 1993) und proinflammatorischen Zytokinen (Hofman et al., 1989; Woodroffe et al., 1993) gezeigt werden. Anhand der in Makrophagen nachgewiesenen Myelindegradationsprodukte und der von Makrophagen exprimierten Aktivierungsmarker lassen sich MS-Läsionen in früh-, spät- und inaktive Herde einteilen (Lucchinetti et al., 1996). Es wird allgemein angenommen, dass dieser chronisch entzündliche Prozess für die Zerstörung der Myelinscheiden verantwortlich ist, obwohl dies bisher nicht einwandfrei bewiesen werden konnte (Lassmann et al., 1995). Die Heterogenität der Läsionen unterschiedlicher Patienten, nicht jedoch innerhalb eines Patienten geben Hinweise auf eventuell verschiedenartige zugrunde liegende Pathomechanismen (Lucchinetti et al., 2000; Ludwin, 2000).

Charakterisierung der Liquorbefunde von MS-Patienten

Die einfachste Möglichkeit, ZNS-nahes Material von MS-Patienten zu untersuchen, ist die Liquorpunktion, die auch entscheidende diagnostische Bedeutung hat. Im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten findet sich eine mäßig erhöhte Zellzahl bis ca. 50/ μ l, wobei es sich vorwiegend um Lymphozyten und Monozyten handelt. Aus dem Liquor von MS-Patienten wurden autoreaktive T-Helferzellen gegen verschiedene Myelinkomponenten isoliert. Es konnten zwar keine Antikörper gegen diese Myelinkomponenten gefunden werden, jedoch antikörperbildende Zellen (Olsson et al.(1), 1990; Sun et al., 1991; Link et al., 1992). Bei den meisten Patienten lässt sich eine intrathekale IgG-Produktion nachweisen, bei 95% sind in der isoelektrischen Fokussierung oligoklonale Banden sichtbar (Olsson, 1994). Des Weiteren wurden erhöhte TNF α -Spiegel im Liquor von MS-Patienten im Schub und Korrelation der TNF α -Spiegel mit dem Ausmaß der Blut-Hirn-Schrankenstörung gezeigt (Sharief et al., 1992).

Charakterisierung der Befunde im peripheren Blut

Aus peripherem Blut von MS-Patienten konnten autoantigenspezifische T-Helferzellen isoliert werden. Diese wurden jedoch auch bei gesunden Probanden gezeigt. Zunächst wurden T-Helferzellen nachgewiesen, die die Hauptkomponente des Myelins, das Myelin Basic Protein (MBP) erkennen (Allegretta et al., 1990). Später folgte die Untersuchung von reaktiven Zellen gegen andere Myelinkomponenten (Sun et al., 1991; Zhang et al., 1993; Bernard et al., 1997), sowie Nicht-Myelinantigene wie zum Beispiel Hitzeschockproteine (van Noort et al., 1995).

Nach polyklonaler Stimulation von Makrophagen und T-Zellen aus peripherem Blut konnten einige Autoren bei MS-Patienten eine erhöhte Produktion von Th1-Zytokinen feststellen und die Zytokinproduktion mit Krankheitsaktivität und Therapieerfolg korrelieren (Beck et al., 1988; Comabella et al., 1998; Becher et al., 1999). Andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen (van Oosten et al., 1998; Durán et al., 2001).

Versuch der Zusammenfassung der pathogenetisch relevanten Ereignisse

Es gibt unterschiedliche Hypothesen, die versuchen, die histo- und immunopathologischen Befunde zu einem einheitlichen Bild zusammenzufügen. Abbildung 1-2 zeigt ein mögliches Modell der Pathogenese der MS: In der Peripherie werden autoreaktive T-Helferzellen aktiviert. Vorstellbare Mechanismen dafür sind die Quervernetzung von T-Zellrezeptoren und MHC-Molekülen durch Superantigene, Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen oder ein verändertes Zytokinmilieu. Aktivierte Lymphozyten können dann die Blut-Hirn-Schranke passieren und durch Autoantigene reaktiviert werden. Es wird angenommen, dass die nachfolgende Entzün-

dungsreaktion für die Demyelinisierung zentraler Axone und die Axondegeneration verantwortlich ist.

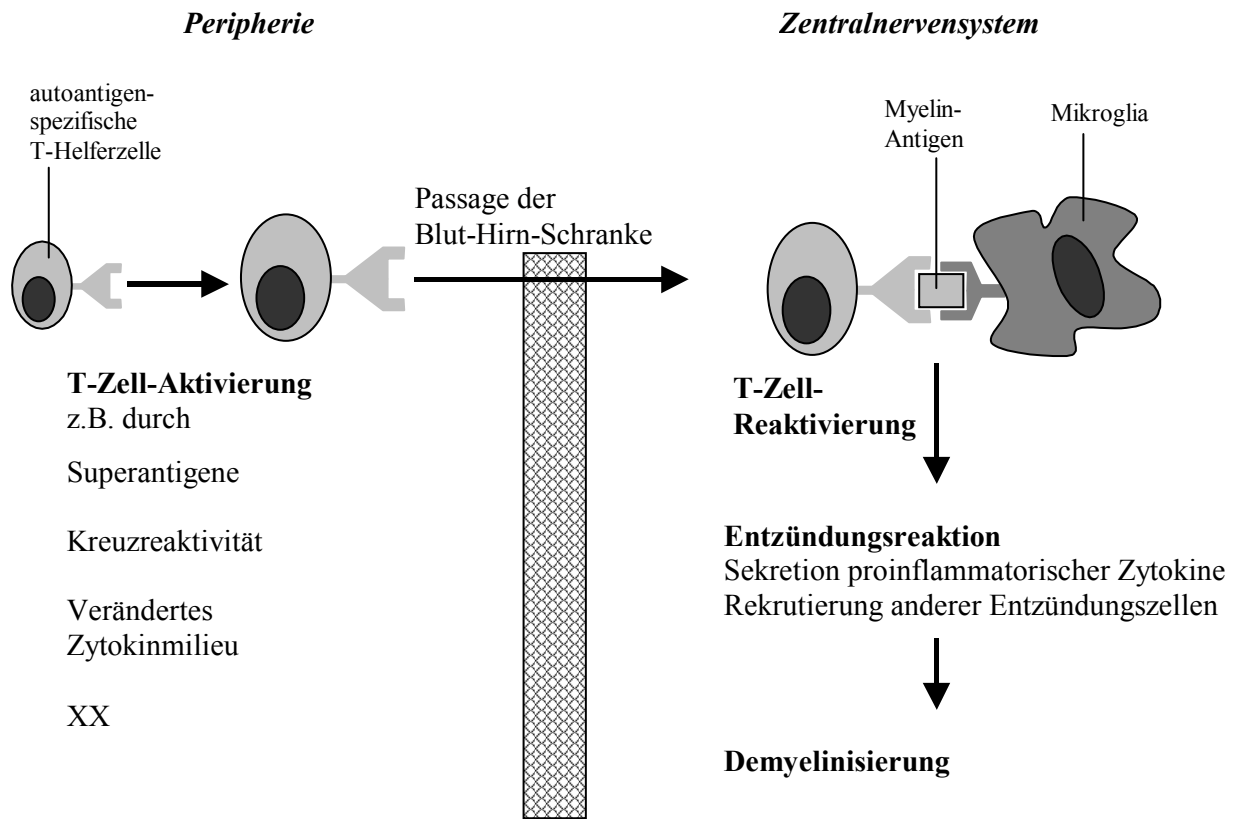


Abbildung 1-2: Schema der Pathogenese der Multiplen Sklerose. In der Peripherie werden autoreaktive T-Helferzellen durch verschiedene Mechanismen, wie z. B. Superantigene, Kreuzreaktivität oder Veränderungen im Zytokinmilieu, aktiviert. Sie können dann die Blut-Hirn-Schranke passieren und lösen nach Reaktivierung durch Autoantigene im ZNS eine Entzündungsreaktion aus, die schließlich zur Demyelinisierung führt.

Zusammenfassend lässt sich aus all diesen Ergebnissen schließen, MS sei eine Erkrankung autoimmunologischer Genese, die durch Umwelteinflüsse während der Kindheit in genetisch empfänglichen Individuen ausgelöst wird.

1.3 Myelin Basic Protein (MBP) als mögliches Autoantigen - Stand der Forschung

MBP ist mit ca. 30% des Myelintrockengewichts die Hauptkomponente der Markscheiden im menschlichen ZNS. Neben drei splicing-Varianten sind strukturell verwandte Isoformen bekannt, die auch außerhalb des ZNS, vorwiegend in Thymus und Lymphgewebe, exprimiert werden (Zelenika et al., 1993). MBP ist das am meisten untersuchte potentielle Autoantigen bei MS.

Neben der Erforschung der pathogenetischen Relevanz dieses potentiellen Autoantigens gibt es mehrere Ansätze zur therapeutischen Anwendung MBP-verwandter Peptide oder Proteine. Das ursprünglich zur Induktion der EAE entwickelte polymere MBP-Analogon Copolymer I zeigte eine unerwartete protektive Wirkung und wird heute als Rezidivprophylaxe eingesetzt (Gran et al., 2000, Neuhaus et al., 2001). Daneben wurden klinische Studien zur Wirksamkeit von sogenannten „altered peptide ligands“ durchgeführt (Kappos et al., 2000; Bielekova et al., 2000). Diese synthetisch hergestellten Peptide unterscheiden sich durch wenige Aminosäuresubstitutionen von einem als immundominant beschriebenen MBP-Peptid. Es wird diskutiert, dass sie die Aktivierung MBP-spezifischer T-Helferzellen modulieren. Beide Studien wurden jedoch abgebrochen – die eine wegen auftretenden Hypersensibilitätsreaktionen, die andere, weil einige Patienten eine erhöhte Schubfrequenz aufwiesen. Bielekova et al. zeigten bei einem Teil dieser Patienten mit häufigeren Schüben eine Expansion proinflammatorischer T-Helferzellen, die spezifisch für die „altered peptide ligands“ und MBP waren. Dies ist ein Hinweis auf die pathogenetische Relevanz MBP-spezifischer T-Zellen. Daneben zeigen diese Studien, dass die Wirkmechanismen der „altered peptide ligands“ bei weitem nicht vollständig verstanden sind.

Unterscheiden sich MBP-spezifische T-Helferzellen von MS-Patienten und Gesunden?

MBP-spezifische T-Helferzellen sind Bestandteil des T-Zellrepertoires sowohl von MS-Patienten als auch von Gesunden. Es stellt sich also die Frage, inwiefern sich diese Immunantwort bezüglich der Frequenz, des Phänotyps oder des Aktivierungsstatus unterscheidet.

Mehrere Studien haben die relativen Häufigkeiten (Frequenzen) MBP-spezifischer T-Helferzellen ermittelt. Einige konnten erhöhte Häufigkeiten bei MS-Patienten nachweisen (Chou et al., 1992; Lodge et al., 1996), während sich die Frequenzen in anderen Studien nicht signifikant unterschieden (Zhang et al., 1992; Tejada-Simon et al., 2001). Es weisen mehrere Ergebnisse darauf hin, dass MBP-spezifische T-Helferzellen bei MS-Patienten im Gegensatz zu Gesunden bereits *in vivo* aktiviert wurden und klonal expandiert sind: Allegretta et al. untersuchten 1990 die Mutationshäufigkeit eines Markergens bei MBP-spezifischen T-Zelllinien von MS-Patienten und Gesunden und fanden vermehrt Mutationen bei Linien von Patienten. Geht man davon aus, dass bei häufigerer Zellteilung vermehrt Zufallsmutationen auftreten, ist dies ein Hinweis auf eine klonale Expansion *in vivo* bei MS-Patienten. Die Aktivierung MBP-spezifischer T-Zellen von MS-Patienten scheint weniger abhängig vom kostimulatorischen CD28/B7-Signal zu sein als die Aktivierung anderer antigenspezifischer T-Helferzellen (Lovett-Racke et al., 1997; Scholz et al., 1998). Zang et al. zeigten 1999, dass MBP-reaktive, Apoptose-sensitive Zellen bei MS-

Patienten *in vivo* persistieren. Dies könnte bedeuten, dass sie der peripheren Toleranz entgehen. Die Frage, ob MBP-spezifische T-Helferzellen im peripheren Blut vorwiegend naive oder Gedächtniszellen sind, wird kontrovers diskutiert: Es gibt Arbeiten, die die Zugehörigkeit dieser Zellen zum Gedächtnispool, d.h. der CD45RO-exprimierenden Zellen, zeigten (Bielekova et al., 1999; Burns et al., 1999), während eine andere Gruppe die Herkunft MBP-spezifischer T-Zelllinien vorwiegend aus CD45RA⁺ naiven Zellen zeigte (Muraro et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es Hinweise auf eine *in vivo* Aktivierung MBP-spezifischer T-Helferzellen bei MS-Patienten gibt, was für deren pathogenetische Relevanz spricht. All diese Erkenntnisse wurden jedoch aus Experimenten an MBP-spezifischen T-Zelllinien oder -klonen gewonnen. Durch die lange *in vitro* Kultivierung sind daraus nur eingeschränkt Rückschlüsse auf *in vivo* Verhältnisse möglich. Es bleibt also zu zeigen, inwieweit diese Ergebnisse durch *ex vivo* Untersuchungen bestätigt werden können.

Es gibt Hinweise auf ein Überwiegen proinflammatorischer MBP-spezifischer CD4⁺-Zellen.

Das Zytokinprofil MBP-spezifischer CD4⁺-Zellen ist heterogen, es zeigt sich jedoch eine Tendenz in Richtung proinflammatorischer Zytokine (Vandevyver et al., 1998). In einigen Studien konnte auch eine verstärkte Th1-Zytokinsekretion bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden (Tejada-Simon et al., 2001; Rohowsky-Kochan et al., 2000).

1.4 Die Detektion antigenspezifischer T-Zellen

Die Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen ist problematisch, da die Frequenz der T-Zellen, die für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind, gering ist. Die verwendeten Methoden müssen also eine hohe Sensitivität aufweisen.

Grundsätzlich kann man die Antigenspezifität von T-Zellen entweder strukturell oder funktionell nachweisen. Strukturell bezeichnet den direkten Nachweis des antigenspezifischen T-Zellrezeptors. Bei einer funktionellen Analyse wird dagegen nach Antigenstimulation die reaktive Aktivierung der T-Zellen, zum Beispiel anhand der Zytokinsekretion oder Proliferation, nachgewiesen. Die Vor- und Nachteile dieser Methoden liegen auf der Hand: Die strukturelle Analyse weist alle antigenspezifischen T-Zellen nach, sagt aber nichts über deren Funktionalität aus. Bei der funktionellen Analyse werden hingegen nur diejenigen Zellen detektiert, die auf die Antigenstimulation mit eben der nachgewiesenen Reaktion antworten.

Zur strukturellen Analyse beschrieben Altman et al. 1996 erstmals die Verwendung von MHC-Peptid-Komplexen, mit deren Hilfe antigenspezifische TCR durchflußzytometrisch detektiert werden können. Zum Einsatz dieser Methode bedarf es jedoch zum einen rekombinanter MHC-Moleküle des jeweiligen HLA-Typs und zum anderen definierte Peptide des Antigens. Diese Methode wird für CD8⁺-Zellen bereits angewandt, während es für die Untersuchung von CD4⁺-Zellen noch technische Probleme zu überwinden gilt.

Als funktioneller Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen dient seit langer Zeit die Detektion reaktiver Proliferation nach Antigenstimulation. Proliferation bzw. DNA-Synthese können durch den Einbau radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Substanzen detektiert werden. Dafür ist jedoch zumindest eine fünftägige Kultur der Zellen notwendig. Das heißt, eine direkte *ex vivo* Detektion spezifischer T-Zellen ist auf diesem Wege nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit des funktionellen Nachweises antigenspezifischer T-Zellen ist die Detektion reaktiv exprimierter Zytokine nach Antigenstimulation. Die Durchflußzytometrie bietet hier die Möglichkeit, Zytokinexpression sowie Koexpression anderer Moleküle auf Einzelzellebene zu untersuchen. Die exprimierten Zytokine werden mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert. Der Nachweis spezifischer T-Zellen durch die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression mittels intrazellulärer Färbung in fixierten Zellen wurde 1998 etabliert und von der gleichen Arbeitsgruppe hinsichtlich der optimalen Kostimulation und Stimulationszeiten in den folgenden Jahren weiter optimiert (Sun et al., 1998; Waldrop et al., 1998; Nomura et al., 2000). Nach sechsstündiger Antigenstimulation mit Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A werden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend können mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern intrazellulär die reaktiv exprimierten Zytokine gefärbt werden. Zudem werden auf der Zelloberfläche der T-Helferzellmarker CD4 und der Aktivierungsmarker CD69 angefärbt (Abb. 1-3).

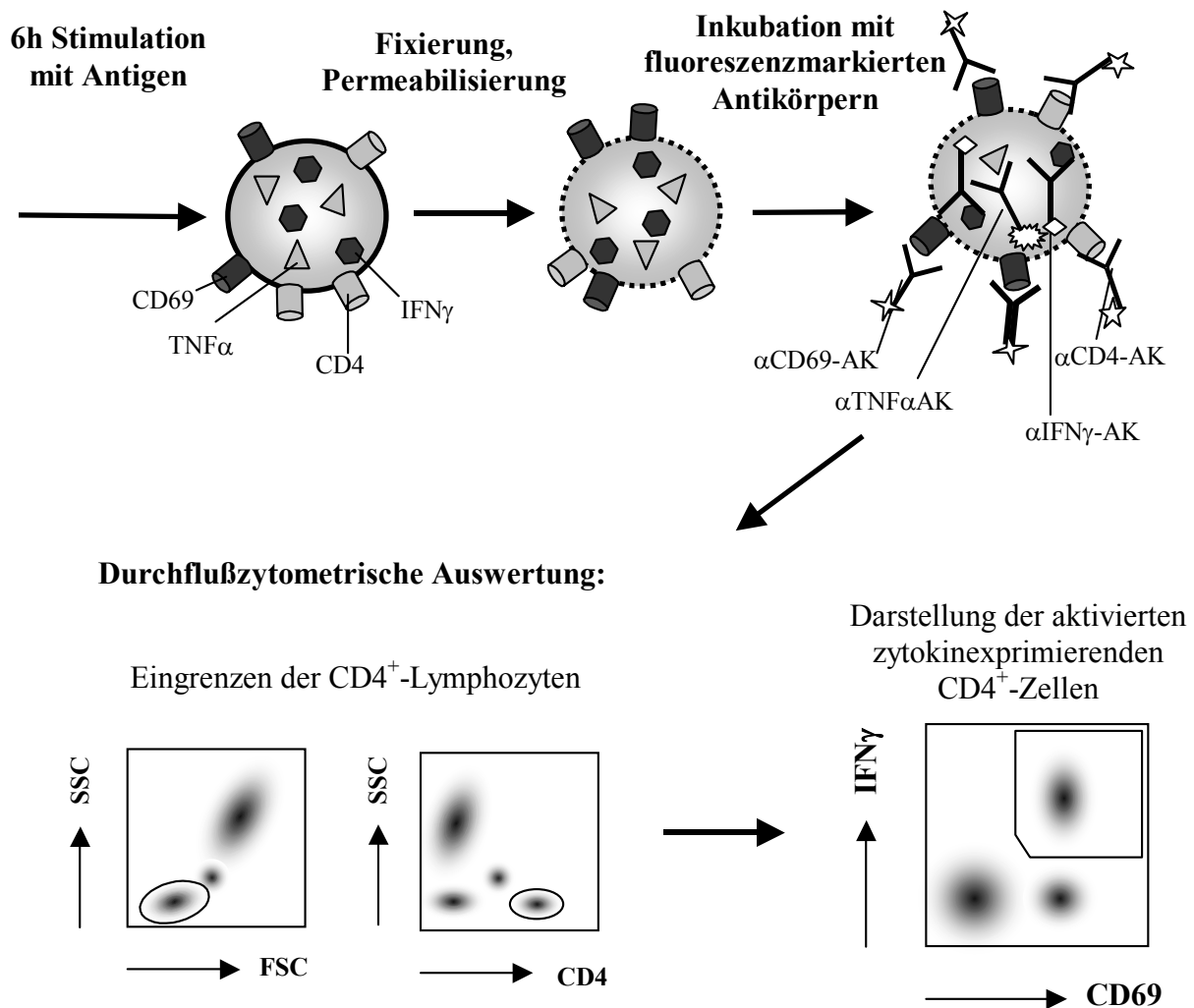


Abbildung 1-3: Prinzip der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression mittels intrazellulärer Zytokinfärbung. Nach sechsstündiger Antigenstimulation werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen den T-Helferzellmarker CD4 und den Aktivierungsmarker CD69, sowie intrazellulär gegen die Zytokine IFN γ und TNF α gefärbt. In der Auswertung werden zunächst CD4⁺-Lymphozyten eingegrenzt und diese dann bezüglich der Aktivierung und Zytokinexpression ausgewertet. Die IFN γ ⁺CD69⁺-Zellen repräsentieren eine antigenspezifische T-Helferzellpopulation.

Ein Nachteil der intrazellulären Zytokinfärbung ist die erforderliche Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Die Detektion sezernierter Zytokine mit Hilfe einer membrangebundenen Fangmatrix (Manz et al, 1995; Brosterhus et al., 1999) erlaubt dagegen den Zytokinnachweis auf lebenden Zellen. Die Grundlage dieses IFN γ -Sekretionsassays bildet ein bivalenter Antikörper, dessen eine Bindungsstelle für das auf allen Leukozyten exprimierte Oberflächenantigen CD45 spezifisch ist. Die andere Bindungsstelle erkennt ein Epitop des Zytokins IFN γ . Dieser Antikörper bildet eine Fangmatrix auf der Zelloberfläche, die dann die während der Sekretionsphase

von der Zelle sezernierten IFN γ -Moleküle „einfängt“. Mit einem zweiten Antikörper, der ein weiteres Epitop des IFN γ -Moleküls erkennt und mit dem Fluorochrom PE markiert ist, werden die IFN γ -sezernierenden Zellen dann angefärbt (Abb. 1-4).

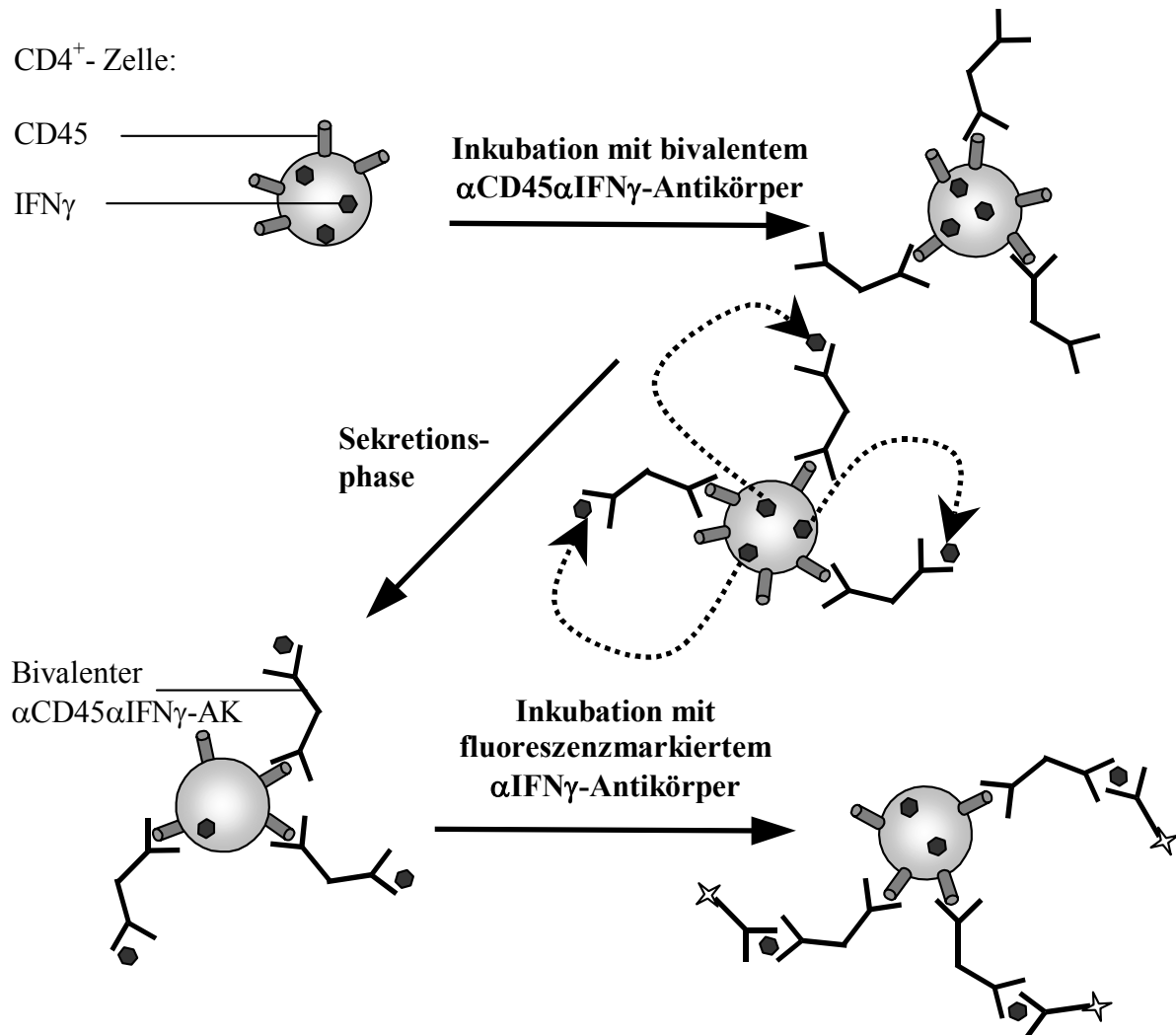


Abbildung 1-4: Prinzip des IFN γ -Sekretionsassays. Nach sechsstündiger Antigenstimulation werden die Zellen mit einem bivalenten α CD45 α IFN γ -Antikörper inkubiert, der eine Fangmatrix für sezerniertes IFN γ bildet. Dieses wird in einer 45minütigen Sekretionsphase eingefangen und mit einem zweiten, fluoreszenzmarkierten α IFN γ -Antikörper angefärbt.

Anschließend können die zytokinexprimierenden Zellen magnetisch angereichert werden (Milenyi et al., 1990). Dies bringt zwei große Vorteile mit sich: Zum einen ist durch diese Anreicherung eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen zu erwarten. Zum anderen eröffnet die Möglichkeit der Isolierung lebender antigenspezifischer T-Helferzellen Optionen wie zum Beispiel die weitere Charakteri-

sierung dieser Zellen oder deren therapeutische Verwendung. So wäre ein therapeutisches Ziel eine *in vitro* Manipulation des Zytokinprofils der proinflammatorischen zu regulatorischen T-Helferzellen, die nach anschließender Reinjektion die Entzündungsvorgänge im ZNS regulieren könnten.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Multiple Sklerose ist wegen ihrer Häufigkeit, des hauptsächlichlichen Auftretens im frühen Erwachsenenalter und der unvorhersehbaren Entwicklung dauerhafter Behinderungen eine Erkrankung von bedeutender gesellschaftlicher und klinischer Relevanz.

Trotz intensiver Bemühungen ist es bislang nicht gelungen, die Ätiologie dieser Krankheit zu ergründen. Es herrscht jedoch weitgehende Einigkeit darüber, dass MS zu den Autoimmunerkrankungen zählt und T-Helferzellen in der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Als Autoantigene werden Komponenten der Myelinscheide, wie zum Beispiel das den Hauptanteil bildende Myelin Basic Protein (MBP), sowie Nicht-Myelinantigene diskutiert. Es gibt Hinweise, dass bei der MS, wie bei einigen anderen Autoimmunerkrankungen auch, ein Überwiegen der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (IFN γ) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) vorliegt und dieses Ungleichgewicht mitverantwortlich für die Pathogenese ist.

Nach wie vor wird nach einem Parameter gesucht, mit dem die Krankheitsaktivität einfach und sicher erfasst werden kann – zur besseren Evaluierung neuer Therapieverfahren und früheren Erkennung von Schüben. Seit vielen Jahren konzentriert sich die Forschung auf den Nachweis autoreaktiver T-Helferzellen bei MS-Patienten und Kontrollpersonen, die sowohl aus peripherem Blut als auch aus Liquor cerebrospinalis isoliert wurden. Bisher war zum Nachweis dieser Zellen deren Kultivierung über Tage bis Wochen nötig. Durch erhebliche technische Fortschritte ist es seit einigen Jahren möglich, antigenspezifische T-Helferzellen durch direkte *ex vivo* Stimulation zu detektieren. Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α MBP-reaktive Th1-Zellen bei MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nachzuweisen.

Besonderer Wert soll auf die Isolierung lebender autoantigenspezifischer Zellen gelegt werden – zum einen als Ausgangspunkt für deren weitere funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung, zum anderen als Möglichkeit zur therapeutischen Anwendung nach *in vitro* Manipulation.

3 Materialien und Methoden

3.1 Lösungen und Geräte

Es werden hier die häufig benutzten Lösungen und Geräte eingeführt, die als Grundlage für alle später beschriebenen Methoden dienen. Materialien, die nur für eine bestimmte Methode gebraucht wurden, werden dort aufgeführt.

3.1.1 Puffer und Medien

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):	2,7 mM Kaliumchlorid (KCL) 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) 137 mM Natriumchlorid (NaCL) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
0,5% Rinderserumalbumin in PBS (PBS-BSA):	5 g/l Rinderserumalbumin (BSA) in PBS
PBS-BSA-EDTA:	2 mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS-BSA
PBS-BSA-Azid:	10% Natriumazid (NaN_3) in PBS-BSA
Kulturmedium:	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, USA) + 100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) + 0,1 mg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) + 0,3 mg/ml Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) + 10% humanes Mischserum (Serum gewonnen aus drei gesunden Spendern, inaktiviert 30 Minuten bei 56°C)

3.1.2 Einmal-Gefäße und Geräte

Einmal-Gefäße: Konische Polypropylen-Röhrchen 15; 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zentrifugen: Multifuge 3 S-R (Heraeus, Berlin, Deutschland)
Biofuge fresco (Heraeus, Berlin, Deutschland)

Alle Zentrifugationsschritte wurden zehn Minuten bei 250xg durchgeführt. Eine Ausnahme bildet die PBMC-Isolierung, wo die Zentrifugationsschritte einzeln aufgeführt sind.

Brutschrank: Heraeus 6000 (Heraeus, Berlin, Deutschland)

Mikroskop: Axiovert (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland)

3.2 Zellpräparation

3.2.1 Gewinnung von peripherenvenösem Blut

Peripherenvenöses Blut von gesunden Probanden und MS-Patienten wurde in natriumheparinisierten Röhrchen des Vacutainer-Systems (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) bzw. ammoniumheparinisierten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und bei Raumtemperatur nicht länger als sechs Stunden aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Periphere mononukleäre Zellen können aufgrund ihrer Dichte von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Hierzu wird verdünntes Vollblut auf eine Schicht Ficoll-Hypaque mit der Dichte 1,077 g/ml gebracht. Nach Zentrifugation flottieren die mononukleären Zellen aufgrund ihrer geringeren Dichte als sogenannte „Interphase“ über der Ficoll-Schicht, während sich Zellen höherer Dichte am Boden des Röhrchens befinden. Als Puffer für die PBMC-Isolierung wurde PBS verwendet, um jegliche unspezifische Stimulation durch Fremdproteine zu vermeiden.

Heparinisiertes Vollblut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend auf raumtemperierten Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 800xg ohne Bremse wurde die Interphase abgenommen, mit PBS aufgefüllt und bei 250xg zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und abschließend 15 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einer definierten Menge Medium oder PBS aufgenommen und gezählt.

3.2.3 Gewinnung von Liquorzellen

Je 10 ml Liquor wurde nach Lumbalpunktion in konische Polypropylen-Röhrchen abgenommen, auf Eis transportiert und direkt verarbeitet. Nach Zentrifugation bei 250xg wurden die Zellen zweimal mit PBS-BSA gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufgenommen.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Mikroskopische Kammerzählung

Eine Möglichkeit der Zellzählung ist das mikroskopische Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Zur Ausgrenzung toter Zellen wurde die Zellsuspension mit 0,4%iger Trypan Blau Lösung (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemischt, welche durch die Zellmembran toter Zellen diffundiert, lebende Zellen jedoch nicht anfärbt.

Die Zellsuspension wurde unter das Deckblatt der Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurden die vier großen Eckquadrate der Neubauer-Kammer mit dem 40er Objektiv des Mikroskops Axiovert (Carl Zeiss, Deutschland). Jedes Eckquadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 . Damit wurden bei einer Kammertiefe von $0,1 \text{ mm}$ insgesamt ein Volumen von $0,4 \text{ }\mu\text{l}$ ausgezählt. Die gesuchte Zellzahl pro ml ergibt sich also aus der Multiplikation der Zahl der in allen vier Quadraten gezählten Zellen mit dem Faktor 2500.

Durchflußzytometrische Zellzählung

Während unter dem Mikroskop nur morphologische Charakteristika zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen berücksichtigt werden können, können bei der Durchflußzytometrie fluoreszenzgefärbte Oberflächenmarker auf Zellen detektiert werden und somit Aussagen über bestimmte Zellpopulationen gemacht werden, die mikroskopisch nicht zu unterscheiden sind. Im Durchflußzytometer werden jedoch nur Frequenzen von Zellen gemessen, ohne das Volumen der Zellsuspension zu berücksichtigen. Um absolute Zellzahlen zu ermitteln, wurden der zu messenden Probe eine kalibrierte Anzahl an fluoreszierenden Mikropartikeln (TruCount Tubes, Becton Dickinson, San Jose, USA) zugesetzt. Diese Partikel können aufgrund ihrer geringen Größe und starken Fluoreszenz von Zellen unterschieden werden. Aus dem Verhältnis der gemessenen zu den ursprünglich zugegebenen Mikropartikeln kann dann die Gesamtzahl der Zellen in der Probe berechnet werden.

3.3 Fluoreszenz als Stoffeigenschaft und deren methodische Nutzung

Fluoreszenz bezeichnet das Leuchten eines Stoffes nach Anregung durch zugeführte Energie (Absorption). Dieses Leuchten entspricht Lichtquanten, die von angeregten Atomen bei der Rückkehr der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau freigesetzt werden (Emission). Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) an Proteine können diese optisch nachweisbar gemacht werden.

3.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich jeweils durch ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum aus. Tabelle 3-1 zeigt die in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.

Tabelle 3-1: In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome.

Fluorochrom	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Hersteller	Verwendung
Fluorescein-Iso- Thio-Cyanat (FITC)	495	519	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1, 2
Carboxyfluorescein Diacetat- Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	491	518	Molecular Probes Leiden, Niederlande	Markierung von PBMC
Phycoerythrin (PE)	480;545;565	575	Molecular Probes Leiden, Niederlande	1, 2
Peridinin- Chlorophyll-a (PerCP)	470	680	Becton Dickinson, San Jose, USA	1
PerCP-Cy5.5	470	695	Becton Dickinson, San Jose, USA	1
Propidiumjodid (PI)	536	617	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Markierung toter Zellen
Allophycocyanin (APC)	650	660	Becton Dickinson, San Jose, USA	1
Cy5	650	666	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden	2

1: verwendet als gekauftes Antikörperkonjugat

2: verwendet als selbstgekoppeltes Antikörperkonjugat

3.3.2 Kopplung von Fluorochromen an Proteine

Es sei hier exemplarisch die Kopplung von FITC an Proteine beschrieben. Das Protein wurde in Boratpuffer (0,1 M Borsäure, 0,025 M Natriumtetraborat, 0,075 M Natriumchlorid, mit Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt) überführt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht. FITC wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, in 50-molarem Überschuss zur Proteinlösung ge-

ben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Konjugat mittels einer PD-10-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in PBS-BSA-Azid überführt. Die Proteinkonzentration und das Kopplungsverhältnis wurden anhand der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) bei 280 nm und bei 495 nm (Absorptionsmaximum von FITC) bestimmt.

Formeln für Kopplung von IgG (Molekulargewicht 150 000):

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (OD_{280} - 0,35 \times OD_{495}) / 1,4$$

$$\text{Kopplungsverhältnis (Fluorochrom/Protein)} = 2,9 \times OD_{495} / (OD_{280} - 0,35 \times OD_{495})$$

3.3.3 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz nutzt fluoreszenzmarkierte Antikörper, um bestimmte Antigene oder Antikörper nachzuweisen. Die Fluoreszenzmessung kann dann in einem Fluoreszenzmikroskop oder in einem Durchflußzytometer erfolgen.

Für diese Arbeit wurde nur die direkte Immunfluoreszenz verwendet, bei der Antikörper mit einer Spezifität für das nachzuweisende Antigen direkt an fluoreszente Farbstoffe gekoppelt sind. Davon unterscheidet man die indirekte Immunfluoreszenz, bei der der antigenspezifische Antikörper durch einen zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen wird.

Mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker humaner Zellen können diese Marker sowohl auf lebenden als auch auf fixierten Zellen nachgewiesen werden. Intrazelluläre Antigene, wie z.B. von der Zelle exprimierte Zytokine, können dagegen nur nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran angefärbt werden. Die verwendeten monoklonalen Antikörper gegen Oberflächenmarker bzw. humane Zytokine sind in Tabelle 3-2 bzw. 3-3 aufgezählt.

Tabelle 3-2: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmarker.

Spezifität	Klon	Markierung	Hersteller
CD4	SK3	PerCP	Becton Dickinson, San Jose, USA
	SK3	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, San Jose, USA
	TT1	Cy5	Hybridomzelllinie und Kopplung DRFZ
CD14	MΦP9	PerCP	Becton Dickinson, San Jose, USA
CD69	L78	FITC	Becton Dickinson, San Jose, USA
		PE	Becton Dickinson, San Jose, USA

Tabelle 3-3: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zytokine.

Spezifität	Klon	Markierung	Hersteller
IFN γ	4SB3	Cy5	Hybridomzelllinie und Kopplung DRFZ
IL2	N748A	PE	Hybridomzelllinie und Kopplung DRFZ
IL4	4D9	PE	Hybridomzelllinie und Kopplung DRFZ
TNF α	1D12	FITC	Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland
	Mab11	APC	Becton Dickinson, San Jose, USA

3.4 *in vitro*-Stimulation humaner Zellen

3.4.1 Stimulationsbedingungen und -zeiten

Alle *in vitro*-Stimulationen wurden für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre im Brutschrank durchgeführt.

Die Stimulation von Vollblut erfolgte mit je einem Milliliter heparinisiertem Vollblut pro Ansatz in Polystyrol-Röhrchen mit rundem Boden (Greiner, Frickenhausen, Deutschland). Die Röhrchen wurden im Brutschrank mit 5-10° Neigung zur Horizontalen inkubiert, um eine größtmögliche Kontaktfläche zwischen der Vollblutprobe und der Oberfläche des Stimulationsröhrchens herzustellen.

Die Stimulation von PBMC wurde in RPMI-Kulturmedium mit den oben (Kap. 3.1.1) aufgeführten Zusätzen durchgeführt. Für den IFN γ -Sekretionsassay betrug die Zellkonzentration 1×10^7 PBMC/ml; die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) stimuliert. Die Stimulationsansätze für die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen (Restimulation der T-Zelllinie bzw. Stimulation von Liquorzellen) wurden in verschließbaren Polystyrol-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit einer Zelldichte von 2×10^6 PBMC/ml durchgeführt. Diese Stimulationsröhrchen wurden, wie bei der Vollblutstimulation beschrieben, im Brutschrank schräg gestellt.

3.4.2 Kostimulation mit α CD28-Antikörpern

An der Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen sind neben der Interaktion der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem CD3-Komplex noch mehrere andere Moleküle beteiligt.

Eines dieser kostimulatorischen Moleküle ist das Antigen CD28, das von T-Zellen exprimiert wird und an CD80 und CD86, beides Oberflächenmoleküle von antigenpräsentierenden Zellen, bindet. In allen Stimulationsansätzen dieser Arbeit wurden Antikörper gegen CD28 (Klon CD28.2, BD Pharmingen, San Diego, USA) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben.

3.4.3 Verwendete Antigene

Es wurden verschiedene Antigene zur Stimulation eingesetzt (Tab. 3-4):

Tabelle 3-4: In dieser Arbeit verwendete Antigene.

Bezeichnung	Hersteller	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1 µg/ml
Tetanus Toxoid (TT)	Chiron Behring, Marburg, Deutschland	20 Limes flocculation (Lf)/ml
Cytomegalie Virus Antigen (CMV)	Biodesign, USA	5 µg/ml
Myelin Basic Protein (MBP)	Institut für Neuroimmunologie der Charite, Berlin, Deutschland nach Eylar, 1971	50 µg/ml
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	0,01 µg/ml
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1 µg/ml

Neben den verschiedenen Antigenstimulationen wurde jeweils eine Probe als Negativkontrolle mitgeführt, die ohne Antigen, aber mit α CD28 inkubiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei der Negativkontrolle parallel zu den antigenstimulierten Ansätzen durchgeführt.

3.4.4 Stimulation einer T-Zelllinie bzw. Stimulation von Liquorzellen

Die Stimulation einer T-Zelllinie bzw. Liquorzellen unterscheidet sich von der Stimulation von Vollblut oder PBMC vor allem durch zwei Besonderheiten: Zum einen besitzen die zu stimulierenden Zellen keine Fähigkeit zur Antigenaufnahme, -prozession und -präsentation. Zum anderen ist die Anzahl der Zellen zu gering für die Durchführung einer *in vitro* Stimulation. Um diese beiden praktischen Probleme zu lösen, wurden autologe PBMC mit Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDA-SE) markiert und zu den Versuchsansätzen zugegeben. CFDA-SE ist ein nicht-fluoreszierendes, sehr gut membrangängiges Molekül. Es wird von intrazellulären Esterasen durch Abspaltung zweier Azetatgruppen in das fluoreszente Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt, das weniger membrangängig ist. Der Succinimidyl Ester-Anteil des Moleküls wiederum ist sehr reaktiv und kann den Carboxyfluorescein-Anteil durch Reaktion an Aminogruppen kovalent an Zellproteine binden. Dadurch werden Zellen fluoreszenzmarkiert und optisch detektierbar. Die Stimulationsbedingungen unterschieden sich nicht von der PBMC-Stimulation bei anderen Versuchen.

3.4.5 Zugabe von Brefeldin A für die intrazelluläre Zytokinfärbung

Brefeldin A (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ist ein Metabolit des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum* und inhibiert den zellulären Sekretionsapparat. Es wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt und jeweils für die letzten vier Stunden der sechsstündigen Stimulationszeit zugegeben. Es wurde Wert darauf gelegt, dass die Stimulationsröhrchen nach Zugabe von Brefeldin A in der gleichen Lage in den Brutschrank gelegt wurden wie in den ersten zwei Stunden der Stimulationszeit, um Zellinteraktionen so wenig wie möglich zu stören.

3.5 Fixierung und intrazelluläre Färbung von Zytokinen

3.5.1 Ablösen der Zellen mit EDTA

Nach der Stimulation wurden die Zellen zunächst mit EDTA von der Oberfläche der Stimulationsröhrchen gelöst. EDTA wurde in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben, anschließend wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Fixierung unterschied sich bei Vollblut und PBMC, da bei den Vollblutproben zunächst die Erythrozyten lysiert wurden.

3.5.2 Lysierung, Fixierung und Permeabilisierung von Vollblut

Zur Lysierung wurden je 9 ml 1+9 mit destilliertem Wasser verdünnte FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, San Jose, USA) zu jeder Vollblutprobe gegeben, diese kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in je 500 µl 1+9 mit destilliertem Wasser verdünnter FACS Permeabilizing Solution (Becton Dickinson, San Jose, USA) resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml PBS-BSA-Azid zugegeben, die Proben zentrifugiert und nach dem Dekantieren des Überstandes das Zellpellet in PBS-BSA-Azid aufgenommen.

3.5.3 Fixierung und Permeabilisierung von PBMC

PBMC wurden nach der EDTA-Zugabe zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 2%iges Formaldehyd (verdünnt in PBS) aufgenommen und 20 Minuten inkubiert. Formaldehyd fixiert Zellen durch Vernetzung von Proteinen und DNA. Die fixierten Zellen wurden in FACS Permeabilizing Solution aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml PBS-BSA-Azid, Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS-BSA-Azid aufgenommen.

3.5.4 Extra- und intrazelluläre Färbung

von fixierten und permeabilisierten Zellen

Die Färbeprozedur ist für Vollblut- und PBMC-Proben die gleiche, die Färbung von Oberflächenmarkern und die intrazelluläre Färbung wurden gleichzeitig durchgeführt. Es wurde eine Färbelösung angesetzt, in der alle benutzten Antikörper in der vorher austitrierten optimalen Konzentration vorlagen. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Fc-Rezeptoren von Monozyten wurde der Färbelösung humanes Immunglobulin (Beriglobin, Centeon, Marburg, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugegeben. Die zu färbenden Zellen wurden in 100 µl Färbelösung aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS-BSA-Azid gewaschen und in PBS-BSA-Azid aufgenommen.

3.6 Technologie der zellulären Affinitätsmatrix:

IFN γ -Sekretionsassay

Neben der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen ist der IFN γ -Sekretionsassay eine weitere Methode des Nachweises antigenspezifischer T-Helferzellen anhand exprimierter Zytokine. Der Unterschied besteht darin, dass die Zellen nicht fixiert werden müssen und damit in einem weiteren Schritt angereichert bzw. lebend isoliert werden können. Die Grundlage des Zytokin-Sekretionsassays bildet ein bivalenter Antikörper, dessen eine Bindungsstelle für das auf allen Leukozyten exprimierte Oberflächenantigen CD45 spezifisch ist. Die andere Bindungsstelle erkennt ein Epitop des Zytokins IFN γ . Dieser Antikörper wird Catch Reagent genannt, weil er eine Fangmatrix auf der Zelloberfläche bildet, die dann die während der Sekretionsphase von der Zelle sezernierten IFN γ -Moleküle „einfängt“. Mit einem zweiten Antikörper, der ein weiteres Epitop des IFN γ -Moleküls erkennt und mit dem Fluorochrom PE markiert ist, werden die IFN γ -sezernierenden Zellen dann angefärbt. Dieser Antikörper wird Detection Antibody genannt (siehe Abb. 1-4).

Es wurden pro Ansatz mindestens 1×10^7 PBMC stimuliert, anschließend mit einem Zellschaber (Sarstedt, Newton, USA) aus der Gewebekulturschale herausgelöst und dann mit 1:5 verdünntem IFN γ Catch Reagent (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) sieben Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Sekretionsphase: Die Zellsuspension wurde in warmem Medium auf eine Zelldichte kleiner als 10^6 /ml verdünnt und 40 Minuten im Brutschrank bei 37°C auf einem Rotationsgerät (Ingenieurbüro CAT, Staufen, Deutschland) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS-BSA-EDTA gewaschen und in 500 μ l Färbelösung zehn Minuten auf Eis extrazellulär gefärbt. Die Färbelösung enthielt PE-markierten IFN γ Detection Antibody (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland), α CD4-Cy5, α CD69-FITC, α CD14-PerCP und humanes Immunglobulin. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-BSA-EDTA gewaschen und dann in PBS-BSA-EDTA resuspendiert.

3.7 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellsortierung (MACS) basiert auf der Markierung von Zellen mit Hilfe von superparamagnetischen Mikropartikeln mit einem Durchmesser von etwa 100 nm, die an Antikörper gekoppelt werden. Im magnetischen Feld können dann die markierten Zellen von den nicht markierten Zellen getrennt werden: Die Zellsuspension wird über eine Säule aus Stahlwolle gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Das Eluat dieser Säule im magnetischen

Feld enthält die nicht markierten Zellen. Eluiert man dann die Säule außerhalb des Magnetfeldes, erhält man die magnetisch markierten Zellen (Abb. 3-1).

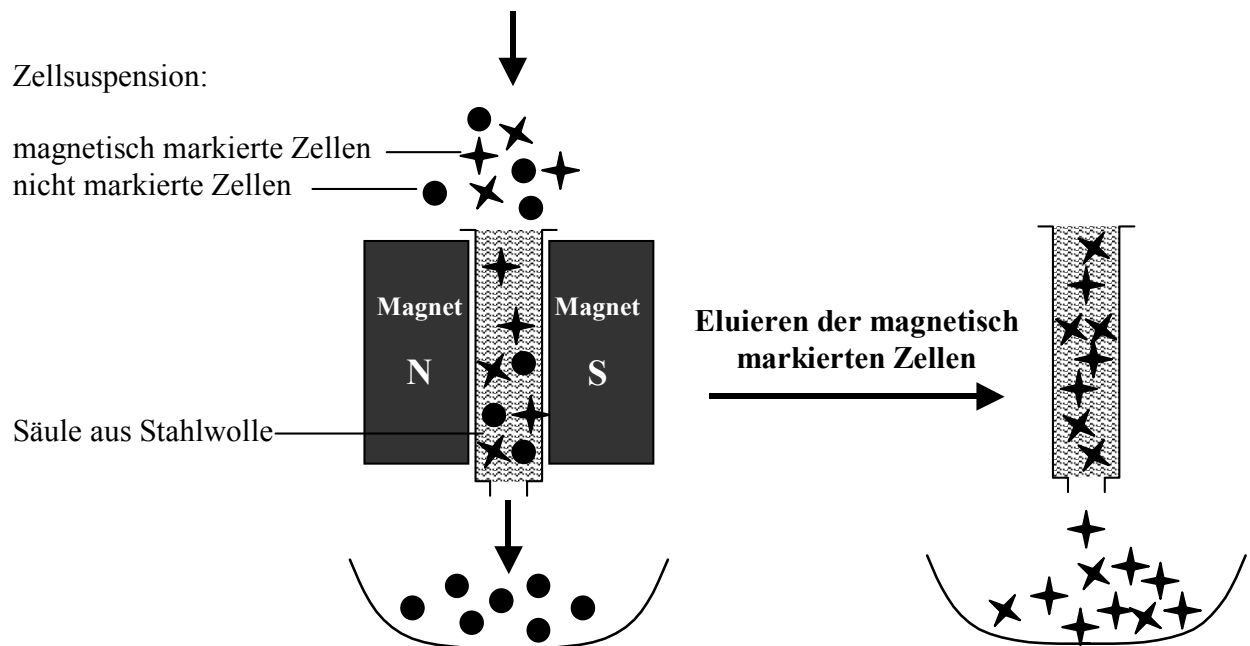


Abbildung 3-1: Prinzip der magnetischen Zellseparation. Zellen werden mit an Antikörpern gebundenen superparamagnetischen Mikropartikeln markiert und anschließend über eine Säule aus Stahlwolle gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Die markierten Zellen erhält man anschließend durch Eluieren der Säule außerhalb des Magnetfeldes.

Dieses System wurde für die Anreicherung IFN γ -sezernierender Zellen genutzt. Die nach dem IFN γ -Sekretionsassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markierten Zellen wurden mit Anti-PE-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) magnetisch markiert und dann angereichert. Nach der Oberflächenfärbung des IFN γ -Sekretionsassays wurden die Zellen mit Anti-PE-Microbeads 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert, dann mit PBS-BSA-EDTA gewaschen und in PBS-BSA-EDTA resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1/20 Aliquot abgenommen und nach PI-Zugabe durchflußzytometrisch analysiert. VS⁺ Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden im magnetischen Feld des MACS-Separationsgerätes aufgestellt und mit zweimal 1 ml entgastem PBS-BSA-EDTA gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension über einen Zellfilter (pre separation filter, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) auf die Säulen gegeben. Die Säule wurde in drei Schritten mit 2 ml, 2 ml und 3 ml Puffer gespült und das Eluat als Negativfraktion aufgefangen und durchflußzytometrisch analysiert. Daraufhin wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die magnetisch markierten Zellen mit 3 ml PBS-BSA-EDTA eluiert. Es folgte ein weiterer Anreicherungsschritt, analog dem ersten, um die Reinheit der magnetisch markierten Zellen zu erhöhen. Die zweite positive

Fraktion, das Eluat aus der zweiten Säule, wurde zentrifugiert, die Zellen in 300 µl Puffer aufgenommen und die ganze Probe im Durchflußzytometer analysiert, nachdem PI zugegeben worden war.

3.8 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie können Zellsuspensionen auf Einzelzellniveau untersucht werden (Radbruch, 2000). Die Zellen werden zunächst durch hydrodynamische Fokussierung in Einzellsuspension gebracht. Die Zellsuspension wird im Probenstrom aus dem Probenreservoir angesaugt. Um diesen herum fließt der Mantelstrom, der eine schnellere Fließgeschwindigkeit aufweist und damit die Zellsuspension in Einzelzelltröpfchen aufteilt (Abb. 3-2).

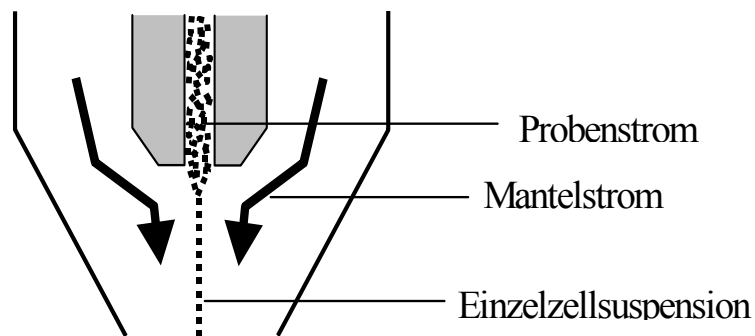


Abbildung 3-2: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Die Fließgeschwindigkeit des Mantelstroms ist höher als die des Probenstroms und vereinzelt so die Zellen zu einer Einzellsuspension.

Die einzelnen Zellen passieren dann einen Laserstrahl, d.h. monochromatische, annähernd parallele Lichtstrahlung. Dadurch entsteht zum einen Streulicht, anhand dessen Aussagen über die Größe und die Granularität gemacht werden können. Zum anderen können Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden.

Das in einem geringen Winkel reflektierte Licht (2-20°) wird als Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) bezeichnet. Es korreliert mit der Zellgröße und dem Brechungsindex, während das im rechten Winkel gestreute „Seitwärtsstreulicht“ (engl. side scatter, SSC) mit der Granularität der Zellen korreliert.

Das entstehende Fluoreszenzlicht wird durch dichrote Teilerspiegel und Bandpassfilter in verschiedene Fluoreszenzspektren aufgetrennt. Nach einer Verstärkung durch Photomultiplierrohren wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in

ein digitales Signal umgewandelt. Die Verstärkung kann linear oder logarithmisch erfolgen (Abb. 3-3).

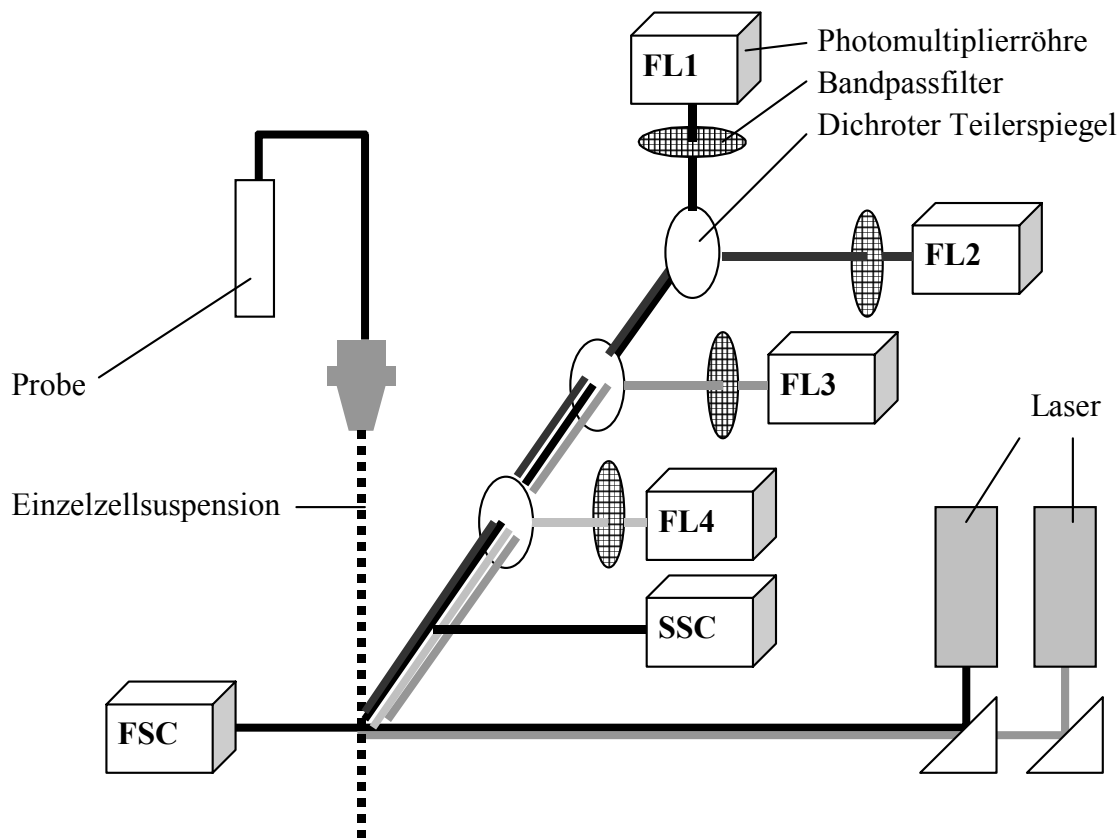


Abbildung 3-3: Prinzip des Durchflußzytometers. Einzelne Zellen werden durch monochromatisches Licht angeregt. Das emittierte Licht verschiedener Wellenlängen wird anschließend durch dichrote Teilerspiegel und Bandpassfilter aufgetrennt und nach Verstärkung durch Photomultiplerröhren gemessen.

Alle für diese Arbeit durchgeführten Messungen wurden am FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) durchgeführt. Im FACS Calibur werden die Zellen von zwei Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Der erste Laser, ein Argonionenlaser, generiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm, der zweite, ein roter Diodenlaser, Licht der Wellenlänge 635 nm. Das heißt, es können Fluorochrome verwendet werden, deren Absorptionsmaximum in einem dieser Bereiche liegt. Das Fluoreszenzlicht wird in vier verschiedene Spektren aufgeteilt, so dass vier verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL) zur Verfügung stehen. Tabelle 3-5 zeigt die Charakteristika dieser Fluoreszenzkanäle.

Tabelle 3-5: Charakteristika der vier zur Verfügung stehenden Fluoreszenzkanäle des FACS Calibur.

Fluoreszenzkanal	Anregung durch	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	eingesetzte Fluorochrome
FL1	Laser1: Argonionenlaser	488	530	FITC CFDA-SE
FL2	Laser1: Argonionenlaser	488	575	PE
FL3	Laser1: Argonionenlaser	488	650	PerCP (-Cy5.5) PI
FL4	Laser2: roter Diodenlaser	635	670	APC Cy5

3.9 Auswertung der durchflußzytometrisch erhaltenen Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CELL Quest (Becton Dickinson, San Jose, USA). Dieses Programm ermöglicht es, Regionen von Zellpopulationen zu definieren und spätere Darstellungen auf diese Populationen zu beschränken. Es wurden Punktdiagramme aus jeweils zwei der sechs gemessenen Parameter erstellt.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) von Microsoft durchgeführt.

Um zu vergleichen, bei prozentual wie vielen Gesunden bzw. MS-Patienten antigenreaktive CD4⁺-Zellen gegen die verschiedenen Antigene nachgewiesen werden konnten, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Zum Vergleich der Frequenzen zytokinexprimierender CD4⁺-Zellen bei Gesunden und MS-Patienten bzw. deren Untergruppen wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als Tendenzen, p-Werte kleiner 0,01 als statistische Signifikanzen angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung

Eine Möglichkeit des Nachweises antigenspezifischer T-Helferzellen ist die Detektion der von T-Helferzellen nach Antigenstimulation reaktiv gebildeten Zytokine mit Hilfe der intrazellulären Färbung. Dazu werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oder Vollblut eines Probanden *in vitro* stimuliert, fixiert, permeabilisiert und anschließend die exprimierten Zytokine intrazellulär mit monoklonalen fluoreszenten Antikörpern gefärbt. Durchflußzytometrisch lassen sich dann die relativen Häufigkeiten von T-Helferzellen identifizieren, die durch Inkubation mit dem Antigen aktiviert wurden.

4.1.1 Vergleich der Vollblutstimulation mit der Stimulation von PBMC

Zur antigenspezifischen Stimulation können sowohl PBMC als auch Vollblut verwendet werden. Ein Vergleich dieser beiden Möglichkeiten bezüglich der Frequenz zytokinexprimierender Zellen nach Stimulation bzw. ohne Stimulation ist also nötig. Ein Teil heparinisierten Blutes eines gesunden Probanden wurde hierzu direkt mit Cytomegalie Virus Antigen (CMV) stimuliert, während aus dem anderen Teil mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und stimuliert wurden. Nach sechsstündiger Stimulation mit Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A nach zwei Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern intrazellulär verschiedene Zytokine, sowie auf der Zelloberfläche der T-Helferzellmarker CD4 und der frühe Aktivierungsmarker CD69 angefärbt. Die Auswertung wurde auf CD4⁺-Lymphozyten beschränkt; ausgewertet wurden die jeweiligen relativen Häufigkeiten (Frequenzen) aktivierter zytokinexprimierender Zellen in CD4⁺-Zellen. Nach Stimulation von Vollblut mit CMV exprimierten relativ mehr T-Helferzellen die untersuchten Zytokine als nach Stimulation von PBMC des gleichen Spenders zum selben Zeitpunkt. Dagegen waren die Frequenzen zytokinexprimierender T-Helferzellen in der unstimulierten Kontrolle der PBMC-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle der Vollblutstimulation höher (Abb. 4-1). Die Vollblutstimulation bietet dementsprechend optimale Bedingungen für die intrazelluläre Zytokinfärbung nach Antigenstimulation.

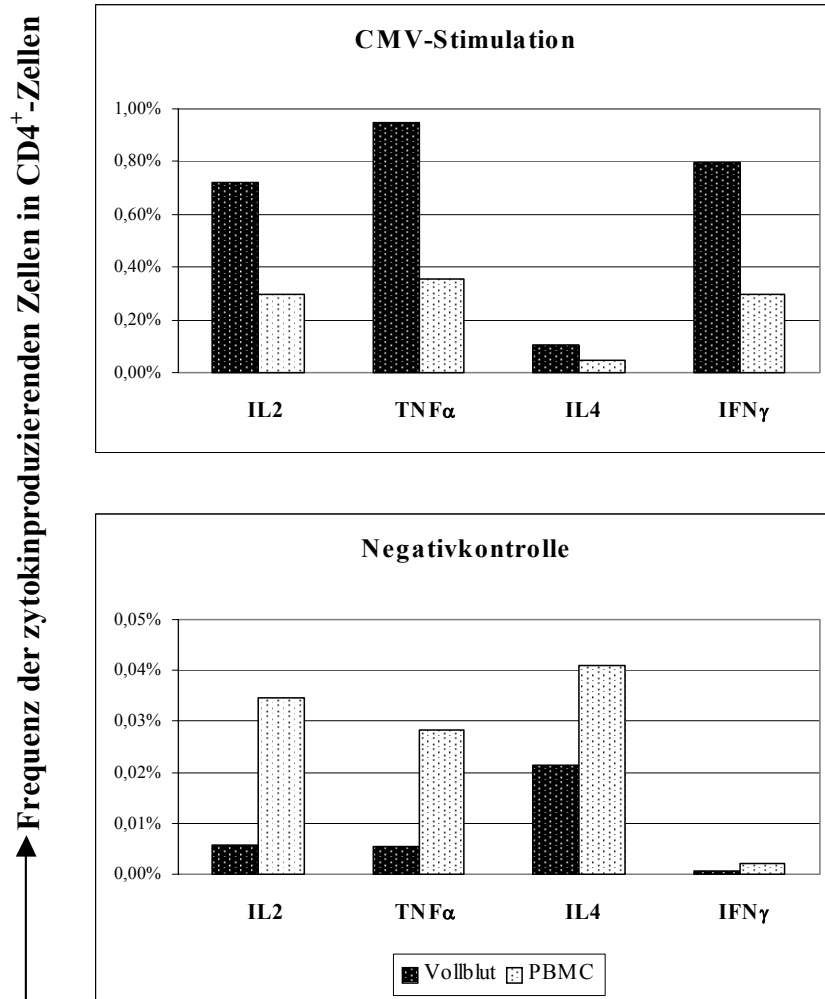


Abbildung 4-1: Vergleich der Vollblutstimulation mit der Stimulation von PBMC. PBMC bzw. Vollblut des gleichen Spenders wurde zeitgleich sechs Stunden mit CMV stimuliert, Brefeldin A wurde nach zwei Stunden zugegeben. Nach anschließender Fixierung und Permeabilisierung wurden auf der Zelloberfläche CD4 und der Aktivierungsmarker CD69 gefärbt, intrazellulär die Zytokine IL2, TNFα, IL4 und IFNγ. Als Negativkontrollen wurden unstimulierte Proben untersucht. Angegeben sind die relativen Häufigkeiten (Frequenzen) zytokinexprimierender aktivierter T-Helferzellen in CD4⁺-Zellen. Alle untersuchten Zytokine wurden nach Vollblutstimulation von einer höheren Frequenz von T-Helferzellen exprimiert als nach Stimulation von PBMC. Dagegen waren die Frequenzen zytokinexprimierender Zellen in der Negativkontrolle der Stimulation von PBMC höher als bei der Stimulation von Vollblut.

4.1.2 „Intra Assay Variabilität“

Die „Intra Assay Variabilität“ beschreibt die Streuung der Werte bei wiederholten Messungen innerhalb eines Experimentes. Zur Bestimmung wurden von einem gesunden Spender jeweils zehn Vollblutproben mit Tetanustoxoid (TT) und Cytomegalie Virus Antigen (CMV) stimuliert.

Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der Messwerte errechnet.

Ein Maß für die Variabilität ist der Variabilitätskoeffizient (VC):

$$\text{Variabilitätskoeffizient} = \text{Standardabweichung} / \text{arithmetischer Mittelwert}.$$

Es zeigte sich, dass der Variabilitätskoeffizient der mit den Antigenen TT bzw. CMV stimulierten Proben von 5,20% bis 8,12% reichte und damit in diesem Frequenzbereich eine gute Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet ist (Tabellen 4-1 und 4-2).

Tabelle 4-1: Berechnung der Variabilitätskoeffizienten der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen. Jeweils zehn Ansätze wurden mit TT bzw. CMV stimuliert. Aus den gemessenen Frequenzen IFN γ -exprimierender Zellen wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus der Variabilitätskoeffizient gebildet.

	Frequenz aktivierter IFNγ-exprimierender Zellen in CD4⁺-Zellen		
	Arithmetischer Mittelwert (\bar{x})	Standardabweichung (SD)	Variabilitätskoeffizient (VC=SD/ \bar{x})
TT-Stimulation	0,04893%	0,00397%	8,12%
CMV-Stimulation	1,02036%	0,06209%	6,09%

Tabelle 4-2: Berechnung der Variabilitätskoeffizienten der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen. Jeweils zehn Ansätze wurden mit TT bzw. CMV stimuliert. Aus den gemessenen Frequenzen TNF α -exprimierender Zellen wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus der Variabilitätskoeffizient gebildet.

	Frequenz aktivierter TNFα-exprimierender Zellen in CD4⁺-Zellen		
	Arithmetischer Mittelwert (\bar{x})	Standardabweichung (SD)	Variabilitätskoeffizient (VC=SD/ \bar{x})
TT-Stimulation	0,10604%	0,00551%	5,20%
CMV-Stimulation	1,11357%	0,05791%	5,20%

4.1.3 Definition des „Cut-off point“

Um antigenreaktive T-Helferzellen von spontan zytokinexprimierenden Zellen abgrenzen zu können, muss bekannt sein, wie stark die Zytokinexpression von T-Helferzellen in der Negativkontrolle schwankt. Es wurden analog zur Bestimmung der „Intra Assay Variabilität“ jeweils zehn Negativkontrollen von zwei Spendern untersucht. Der Variabilitätskoeffizient lag hier deutlich höher, er reichte bis zu 94,79%. Dies erklärt sich durch die Nähe der Messwerte zum

Nullpunkt, einige gemessene Frequenzen waren sogar gleich null. Aus dieser hohen relativen Schwankungsbreite ergab sich das Problem der Definition einer Nachweisgrenze. Der sonst häufig verwendete Stimulationsindex (Quotient zwischen antigenstimulierter Probe und Negativkontrolle, der ab dem Wert drei als signifikant angesehen wird) konnte hier nicht verwendet werden, da die relative Schwankung der Negativkontrollen zu hoch ist. Die absolute Schwankung der Negativkontrollen belief sich bei wiederholten Mehrfachmessungen jedoch immer auf Werte kleiner 0,02%. Es wurde daher die Definition eines „Cut-off point“ festgelegt:

Der Nachweis zytokinexprimierender Zellen ist als antigenspezifische T-Helferzellantwort zu bewerten, wenn die Frequenz $IFN\gamma$ -exprimierender T-Helferzellen oder die der $TNF\alpha$ -exprimierenden Zellen in $CD4^+$ -Zellen um mindestens 0,02% höher liegt als in der Negativkontrolle.

Da die Genauigkeit der errechneten Frequenzen von der Gesamtzahl der durchflußzytometrisch gezählten Zellen abhängt, wurden nur Daten in die Gesamtauswertung einbezogen, bei denen mindestens 100 000 $CD4^+$ -Zellen gezählt worden waren.

4.1.4 Verlaufsanalyse der antigenspezifischen Zytokinantwort

Unabhängig von der Reproduzierbarkeit der Methodik stellte sich die Frage, inwieweit die antigenspezifische Immunantwort eines Probanden zu verschiedenen Zeitpunkten schwankt. Es wurden deshalb über einen Zeitraum von zwei Monaten bei drei verschiedenen Spendern wiederholt Blutproben entnommen, mit den Antigenen TT und CMV stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD4 und CD69 sowie intrazellulär gegen die Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ gefärbt. Untersucht wurden Blutproben zu Beginn des Experimentes, sowie einen Tag danach, eine Woche, einen Monat und zwei Monate später. Um den zeitlichen Verlauf der relativen Ab- oder Zunahme der Frequenz von zytokinbildenden Zellen zu verdeutlichen, wurde zunächst der arithmetische Mittelwert der Messwerte zu allen untersuchten Zeitpunkten gebildet. Untersucht wurde dann die prozentuale Abweichung der einzelnen Messwerte von diesem Mittelwert:

$$\text{Prozentuale Abweichung} = (\text{Messwert} - \text{Mittelwert}) / \text{Mittelwert}$$

Exemplarisch sei hier für einen Spender der Verlauf der antigenreaktiven Zytokinexpression nach Stimulation mit TT bzw. CMV gezeigt (Abb. 4-2).

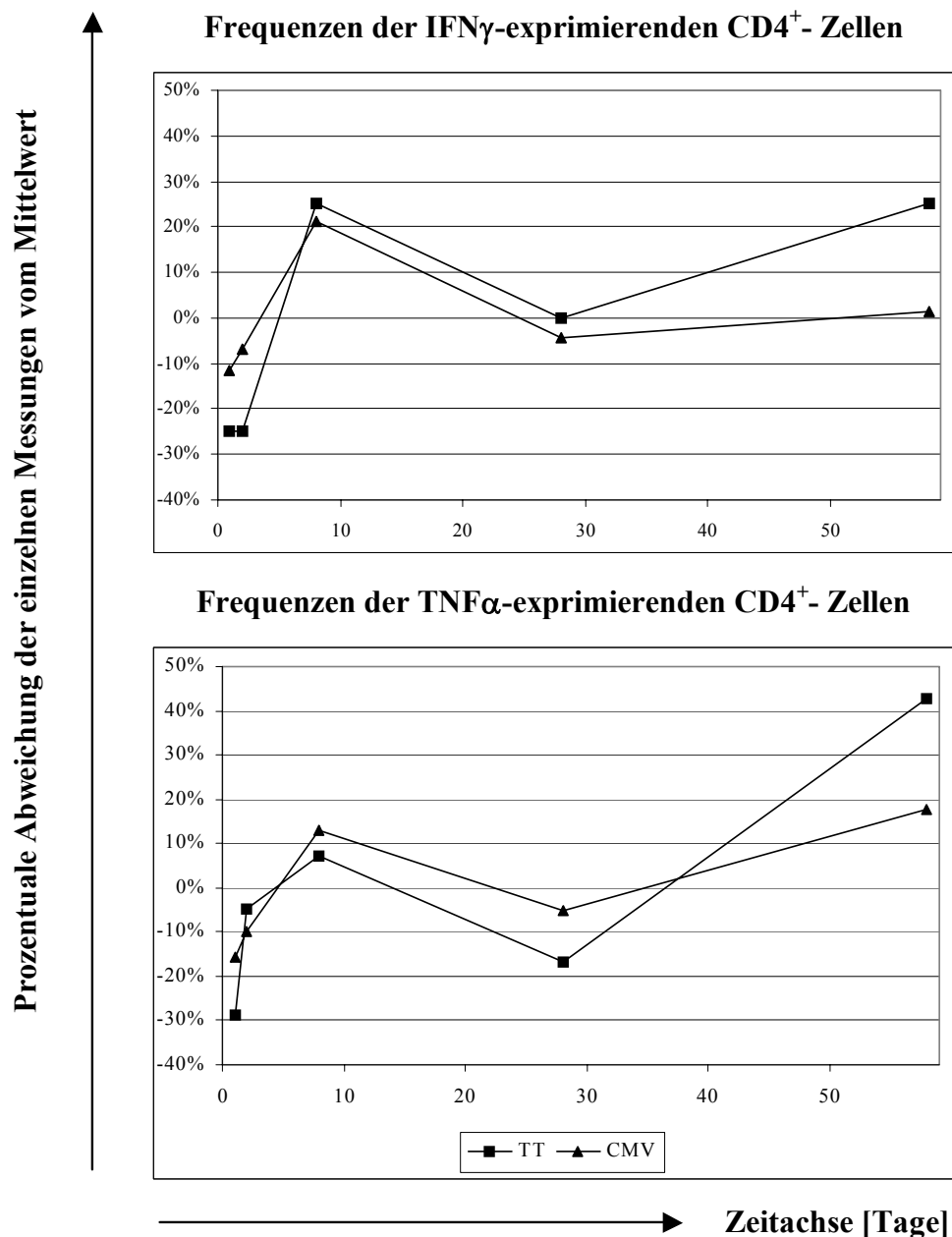


Abbildung 4-2: Verlauf der Zytokinantwort TT- bzw. CMV-spezifischer T-Helferzellen bei einem gesunden Probanden. Vollblutproben wurden im Verlauf von zwei Monaten mit den Antigenen TT und CMV stimuliert und intrazellulär die Zytokine IFN γ und TNF α angefärbt. Die arithmetischen Mittelwerte der Frequenzen TT-reaktiver T-Helferzellen betrugen im Mittel 0,04% (IFN γ) bzw. 0,08% (TNF α), die CMV-reaktiver Zellen 0,86% (IFN γ) bzw. 0,84% (TNF α) in CD4⁺-Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Abweichungen der einzelnen Messwerte von diesen Mittelwerten.

Die Messwerte des hier gezeigten Probanden zeigen Abweichungen von –25% bis +25% bei den Frequenzen IFN γ -exprimierender T-Helferzellen bzw. -30% bis +42% für die Frequenzen der TNF α -Produzenten. Bei den anderen beiden untersuchten Probanden waren die Ergebnisse

vergleichbar, die minimale Abweichung einer gemessenen Reihe betrug $-10/+12\%$, das Maximum $-41/+54\%$. Es fällt auf, dass sich die Zytokinexpression als Antwort auf die beiden Antigene bei einem Spender zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils in die gleiche Richtung, d.h. zu höheren oder niedrigeren Frequenzen hin, verändert. Es sei aber angemerkt, dass diese Tendenz bei jedem der untersuchten Probanden unterschiedlich war.

4.2 Etablierung des IFN γ -Sekretionsassays

Der IFN γ -Sekretionsassay stellt eine weitere Möglichkeit des Nachweises reaktiver Zytokinexpression nach Antigenstimulation dar. Im Gegensatz zur intrazellulären Zytokinfärbung werden die Zellen bei dieser Methode nicht fixiert. Das sezernierte Zytokin wird an einen bivalenten α CD45 α IFN γ -Antikörper außen an die Zellmembran gebunden und kann dort mit einem weiteren α IFN γ -Antikörper an lebenden Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 1-4).

4.2.1 Kinetik des IFN γ -Sekretionsassays

Zur Bestimmung der optimalen Stimulationsdauer wurden von einem gesunden Spender jeweils vier Vollblutproben mit CMV stimuliert und eine Probe als Negativkontrolle nicht stimuliert. Untersucht wurden Stimulationszeiten von vier bis 36 Stunden. Die Frequenz aktivierter IFN γ -sezernierender Zellen war nach einer Stimulationsdauer von zwölf Stunden maximal (Abb. 4-3).

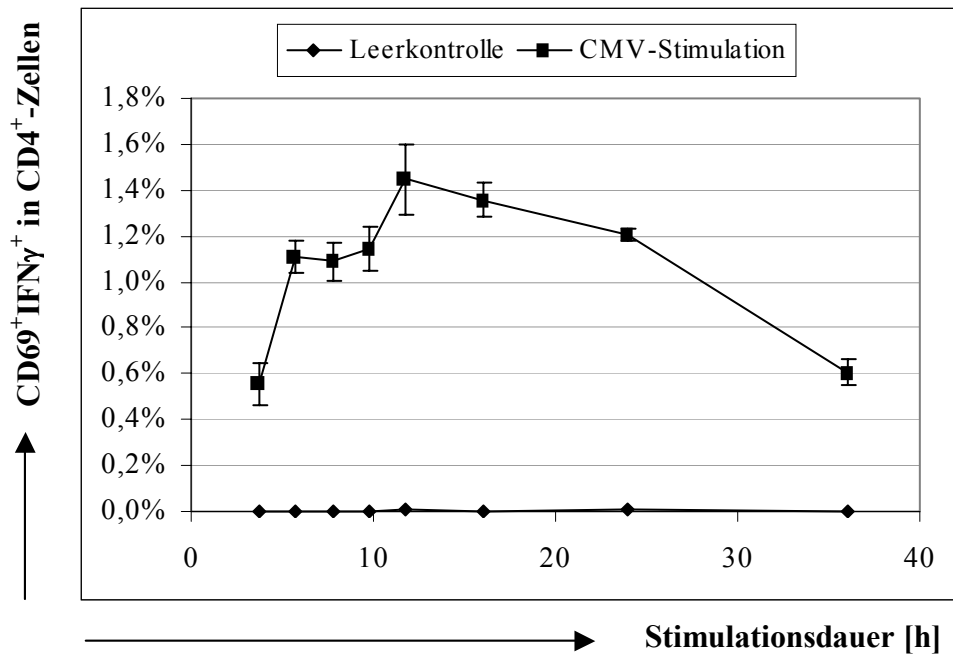


Abbildung 4-3: Kinetik der IFN γ -Sekretion nach CMV-Stimulation. Vollblut wurde mit dem Antigen CMV stimuliert und anschließend sezerniertes IFN γ mit Hilfe des IFN γ -Sekretionsassays nachgewiesen. Außerdem wurden CD4 und CD69 auf der Zelloberfläche gefärbt und tote Zellen sowie Makrophagen mittels PI bzw. CD14-Färbung ausgegrenzt. Dargestellt sind die Frequenzen aktivierter (CD69 $^{+}$) IFN γ^{+} CD4 $^{+}$ -Zellen als Mittelwert vier untersuchter Proben sowie deren Standardabweichung.

Es fiel jedoch auf, dass die mittlere Fluoreszenz der detektierten IFN γ^{+} Zellen nach einem Maximum bei sechs Stunden wieder abfiel. Dagegen nahm die Anzahl der aktivierten, CD69 $^{+}$ -Zellen, die kein Zytokin bilden, zu (Abb. 4-4).

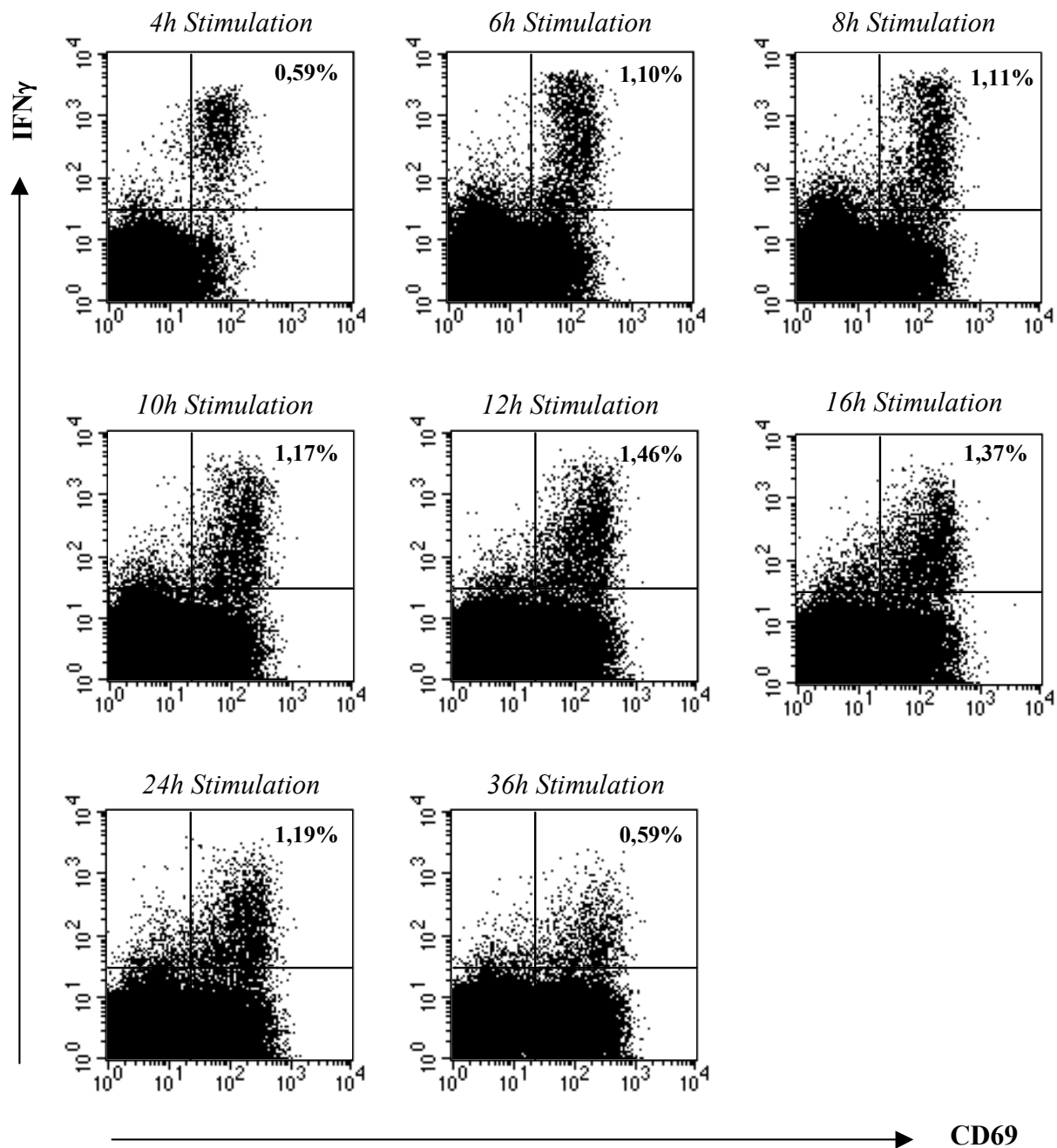


Abbildung 4-4: Kinetik der IFN γ -Expression nach CMV-Stimulation. Das Experiment wurde wie in Abb. 4-3 beschrieben durchgeführt. Die hier dargestellten Punktdiagramme sind auf lebende CD4⁺-Lymphozyten beschränkt. Während die Frequenz IFN γ -exprimierender aktivierter CD4⁺-Zellen nach zwölf Stunden ihr Maximum erreichte, nahm nach sechs Stunden die mittlere Fluoreszenz der IFN γ -exprimierenden T-Helferzellen wieder ab und die Frequenz der aktivierten (CD69⁺) Zellen, die kein Zytokin bilden, zu.

Alle weiteren Experimente mit dem IFN γ -Sekretionsassay wurden nach einer Stimulationsdauer von sechs Stunden durchgeführt.

4.2.2 Bestimmung der Rückgewinnungsrate

Nach der Detektion antigenspezifischer Zellen und anschließender magnetischer Anreicherung ist es nicht mehr möglich, Aussagen über Frequenzen in der Ausgangslösung, z.B. Vollblut, zu machen. Um solche Frequenzen nachträglich berechnen zu können, müssen Angaben darüber vorliegen, wie viel Prozent der Zellen nach welchem Schritt des Experimentes rückgewonnen werden können. Um diese Angaben machen zu können, wurden während eines IFN γ -Sekretionsassays nach CMV-Stimulation in den verschiedenen Phasen des Experimentes definierte Aliquots der Zellsuspension entnommen. Die Proben wurden anschließend mit einer kalibrierten Anzahl an fluoreszenten Mikropartikeln („beads“) versetzt und dann durchflußzytometrisch untersucht. Mit Hilfe des Verhältnisses der gemessenen fluoreszenten beads zur Gesamtzahl der zugesetzten beads ließ sich so rückrechnen, wie viele Zellen insgesamt in der Zellsuspension vorhanden waren. In Tabelle 4-3 sind für die verschiedenen Phasen des Versuches die so berechneten Zellzahlen angegeben, sowie die errechnete Rückgewinnungsrate der CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺-Zellen, d.h. derjenigen Zellen, die es anzureichern galt. Daraus ergibt sich, dass die Rückgewinnungsrate nach Stimulation, Sekretionsphase und anschließender Färbung 28% beträgt, während die magnetische Anreicherung über zwei Säulen fast keinen Verlust von Zellen bedeutet, so dass insgesamt 27% der zu Beginn des Experimentes gezählten Zellen schließlich in der Auswertung wiedergefunden wurden. Der vermeintliche geringe Zugewinn von Zellen während der ersten Phase der Anreicherung ist durch Messungenauigkeiten der Volumina zu erklären.

Tabelle 4-3: Zur Berechnung des Zellverlustes während der einzelnen Schritte des Experimentes wurden zu verschiedenen Zeitpunkten definierte Aliquots entnommen, mit fluoreszierenden Mikropartikeln versetzt und so die Zellzahl der gesamten Probe bestimmt.

Schritt des Experimentes	Lebende Lymphozyten in gesamter Probe	CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ in gesamter Probe	Errechnete Rückgewinnungsrate
vor Stimulation	4,07x10 ⁷		
nach Sekretionsphase und Färbung	1,15x10 ⁷	2,99x10 ⁴	28%
nach Anreicherung über eine Säule		3,18x10 ⁴	30%
nach Anreicherung über zwei Säulen		2,93x10 ⁴	27%

4.2.3 Berechnung des Stimulationsindex

Zur Bewertung, ob eine Probe nach Antigenstimulation eine T-Helferzellaktivierung im Sinne einer erhöhten Frequenz an Zytokinproduzenten aufweist, wurde der Stimulationsindex errechnet. Der Stimulationsindex (SI) berechnet sich aus dem Quotient der Anzahl IFN γ -exprimierender T-Helferzellen in Anwesenheit von Antigen und deren Anzahl ohne Antigenpräsenz. Als Grenzwert wurde folgende gängige Definition benutzt:

Der Nachweis zytokinexprimierender Zellen ist als antigenspezifische T-Helferzell-Antwort zu bewerten, wenn der Stimulationsindex mindestens drei beträgt.

Es wurde außerdem eine Mindestanzahl der angereicherten CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺-Zellen von 20 Zellen festgelegt, die als Grenze der Populationsbildung angesehen wurde.

4.3 Bestimmung der Sensitivität der verwendeten Methoden

Es stellte sich die Frage nach der Sensitivität der beiden verwendeten Methoden: Welche Frequenz von zytokinexprimierenden Zellen kann mit der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen bzw. mit dem IFN γ -Sekretionsassay gerade noch nachgewiesen werden? Zur Bestimmung wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Eine mit CMV stimulierte Probe wurde 1:5 mit einer unstimulierten Probe versetzt, diese verdünnte Probe dann wiederum 1:5 mit einer unstimulierten Probe gemischt, bis schließlich eine 1:625 Verdünnung erreicht wurde (Abb. 4-5).

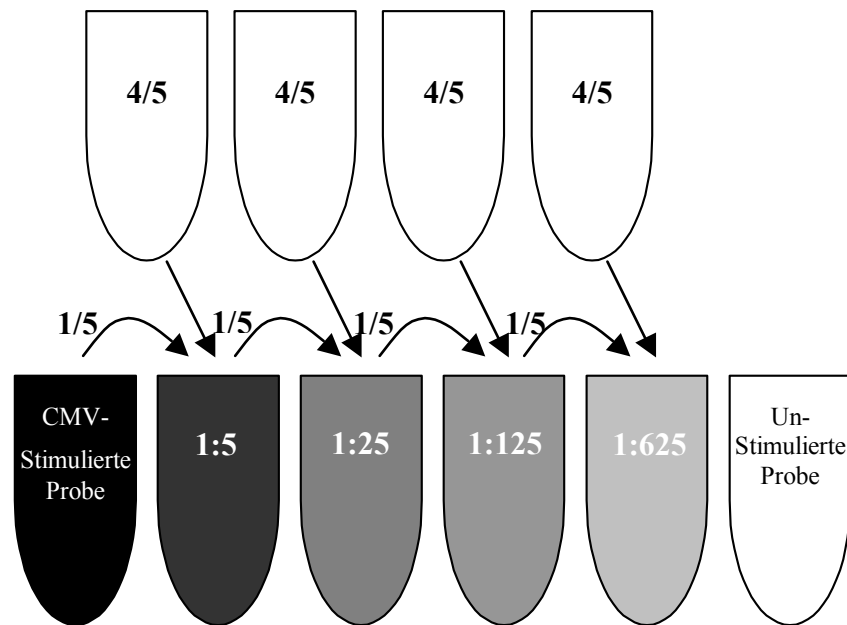


Abbildung 4-5: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität. Eine CMV-stimulierte Probe wurde mit einer unstimulierten Probe 1:5 verdünnt, diese Verdünnung dann wiederum 1:5 mit einer unstimulierten Probe versetzt usw., bis eine Verdünnung von 1:625 entstand.

Die Verdünnungsreihen wurden jeweils parallel für die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen und den Sekretionsassay durchgeführt, d.h. es wurde Vollblut bzw. PBMC des gleichen gesunden Probanden zum selben Zeitpunkt verwendet. Insgesamt wurden drei Verdünnungsreihen untersucht. Anschließend wurde anhand der in Kapitel 4.1.3 bzw. 4.2.3 definierten Kriterien bewertet, ob in den einzelnen Verdünnungsschritten antigenspezifische zytokinexprimierende T-Helferzellen nachgewiesen werden konnten. Da jeder Spender mit einer anderen Frequenz von IFN γ -exprimierenden T-Helferzellen auf die CMV-Stimulation reagierte, musste eine Möglichkeit gefunden werden, um die drei Verdünnungsreihen miteinander zu vergleichen. Anhand der in der intrazellulären Färbung gemessenen Frequenz IFN γ -exprimierender T-Helferzellen in CD4⁺-Zellen der unverdünnten CMV-stimulierten Probe wurde deshalb für die einzelnen Verdünnungsstufen die theoretische Frequenz von IFN γ -exprimierenden Zellen in PBMC errechnet und als Maßstab für die Sensitivität definiert.

4.3.1 Sensitivität der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen nach sechsständiger Antigenstimulation

In Abbildung 4-6 sind den mit Hilfe der intrazellulären Färbung gemessenen Frequenzen der IFN γ -produzierenden Zellen die jeweils berechnete Frequenz in PBMC zugeordnet. Beide Skalierungen sind logarithmisch, jede Kurve repräsentiert eine Verdünnungsreihe. Die schwarz

ingezeichneten Messwerte repräsentieren Proben, die als antigenspezifische T-Helferzellantwort bewertet wurden. Grau sind alle Messwerte eingezeichnet, bei denen keine antigenspezifische Zytokinexpression nachgewiesen werden konnte.

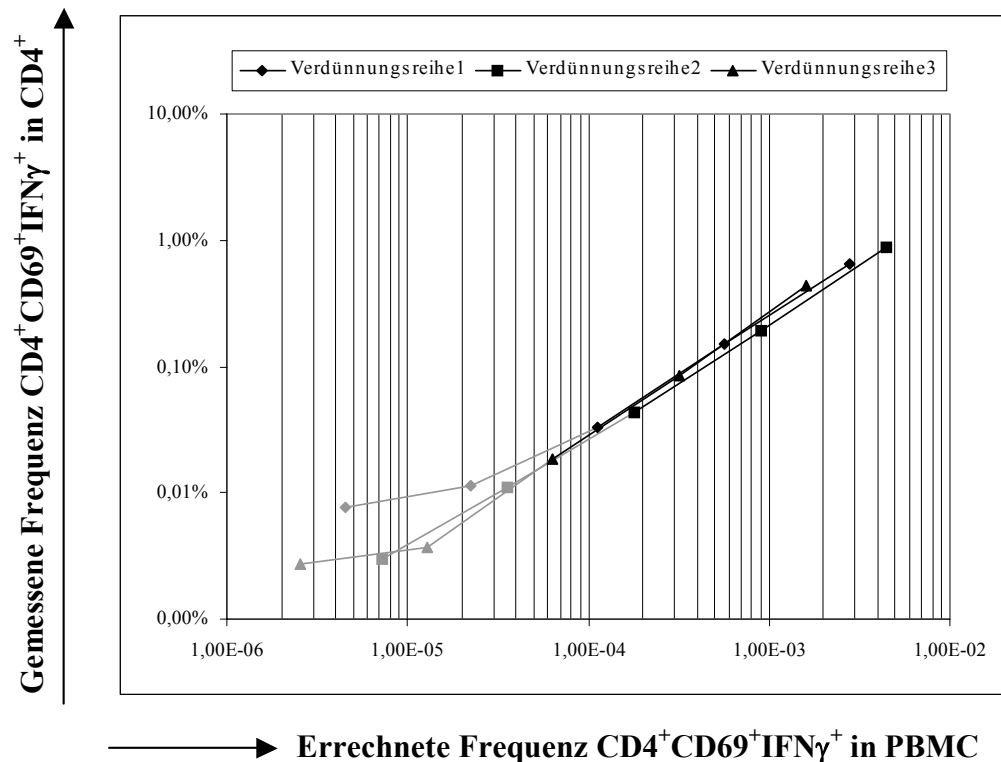


Abbildung 4-6: Verdünnungsreihen der intrazellulären Zytokinfärbung. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Experimenten. Auf der x-Achse sind die rückgerechneten Frequenzen in PBMC angegeben, auf der y-Achse sind die gemessenen Frequenzen zytokinexprimierender T-Helferzellen in CD4⁺-Zellen aufgetragen. Messwerte, die als Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen bewertet wurden, sind schwarz eingezeichnet. Die grauen Messwerte repräsentieren Proben, in denen keine antigenspezifische T-Helferzellantwort detektiert wurde. Der lineare Verlauf der Kurven spiegelt den Sensitivitätsbereich bis ca. 1×10^{-4} in PBMC wider.

Alle drei Verdünnungsreihen zeigen bei Frequenzen größer als 1×10^{-4} IFNγ-exprimierender T-Helferzellen in PBMC einen linearen Verlauf. Im Bereich der Proben, bei denen keine antigenspezifische Stimulation nachgewiesen werden konnte, ist der Kurvenverlauf nicht mehr linear, sondern nähert sich der Leerkontrolle an bzw. spiegelt deren Schwankungen wider.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mit der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung eine Frequenz von ca. 1×10^{-4} IFNγ-exprimierenden T-Helferzellen in PBMC gerade noch nachgewiesen werden können.

4.3.2 Sensitivität des IFN γ -Sekretionsassays mit nachfolgender magnetischer Anreicherung

Den im IFN γ -Sekretionsassay ermittelten Stimulationsindizes sind in Abb. 4-7 die jeweils rechnerisch ermittelten Frequenzen IFN γ -exprimierender T-Helferzellen in PBMC zugeordnet. Die schwarz eingezeichneten Messwerte repräsentieren Proben, bei denen antigenspezifische T-Helferzellen nachgewiesen werden konnten. Grau sind die Messwerte aller Proben eingezeichnet, bei denen keine antigenspezifische T-Helferzellantwort detektiert wurde. Der lineare Verlauf der Kurven spiegelt den Sensitivitätsbereich der Methode bis ca. 2×10^{-5} wider, während unterhalb dieser Grenze die Kurven nicht mehr linear verlaufen.

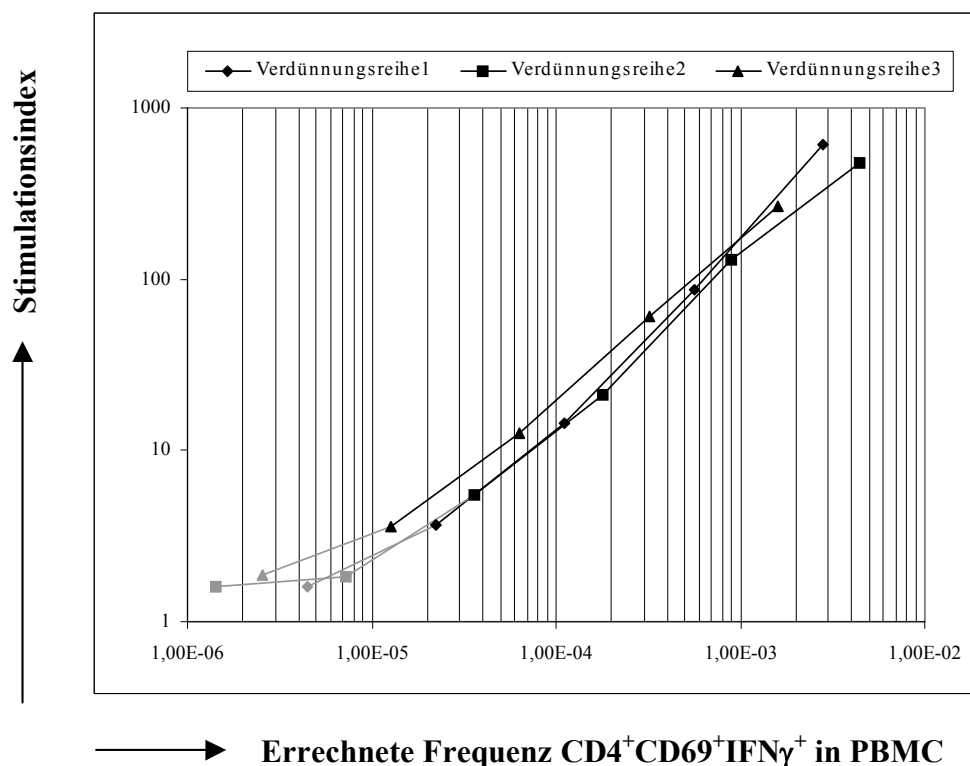


Abbildung 4-7: Verdünnungsreihe des IFN γ -Sekretionsassays. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Experimenten. Auf der x-Achse sind die rückgerechneten Frequenzen in PBMC angegeben, auf der y-Achse sind die gemessenen Stimulationsindizes aufgetragen. Messwerte, die als Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen bewertet wurden, sind schwarz eingezeichnet. Die grauen Messwerte repräsentieren Proben, in denen keine antigenspezifische T-Helferzellantwort detektiert wurde. Der lineare Verlauf der Kurven spiegelt den Sensitivitätsbereich bis ca. 2×10^{-5} in PBMC wider.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mit dem IFN γ -Sekretionsassay eine Frequenz von ca. 2×10^{-5} IFN γ -exprimierenden T-Helferzellen in PBMC gerade noch nachgewiesen werden können.

4.4 Nachweis der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von MBP durch antigenpräsentierende Zellen (APC)

Wird eine Blutprobe mit einem Antigen stimuliert, muss dieses Antigen zunächst von phagozytierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und dann in MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Erst auf diesem Wege wird es von T-Helferzellen erkannt und kann diese zur Zytokinexpression anregen. Um sicherzustellen, dass Myelin Basic Protein (MBP) von antigenpräsentierenden Zellen des peripheren Blutes aufgenommen und präsentiert werden kann, wurden folgende Versuche durchgeführt.

4.4.1 Aufnahme von FITC-markiertem MBP durch APC

Zunächst wurde MBP an das Fluorochrom FITC gekoppelt. Anschließend wurden PBMC eines gesunden Spenders zwei Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Protein inkubiert, mit Formaldehyd fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden PBMC untersucht, die mit FITC-markiertem Ovalbumin bzw. ohne Antigen inkubiert worden waren.

Ovalbumin ist ein 45 000 Dalton schweres Glykoprotein, das die Hauptkomponente von Hühner-eiweiß darstellt. Es wird von phagozytierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und die Peptidfragmente in MHC-Molekülen präsentiert. Abbildung 4-8 stellt die gemessenen Ergebnisse dar: Anhand der auf der Ordinate aufgetragenen seitlichen Lichtstreuung, die die Granularität der Zellen repräsentiert, lassen sich Monozyten von Lymphozyten unterscheiden. Es ist erkennbar, dass die Zellen in der Negativkontrolle die Autofluoreszenz im ersten Fluoreszenzkanal (FL1) nicht überschreiten, während in den mit Ovalbumin-FITC bzw. MBP-FITC inkubierten Proben die Monozyten eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen.

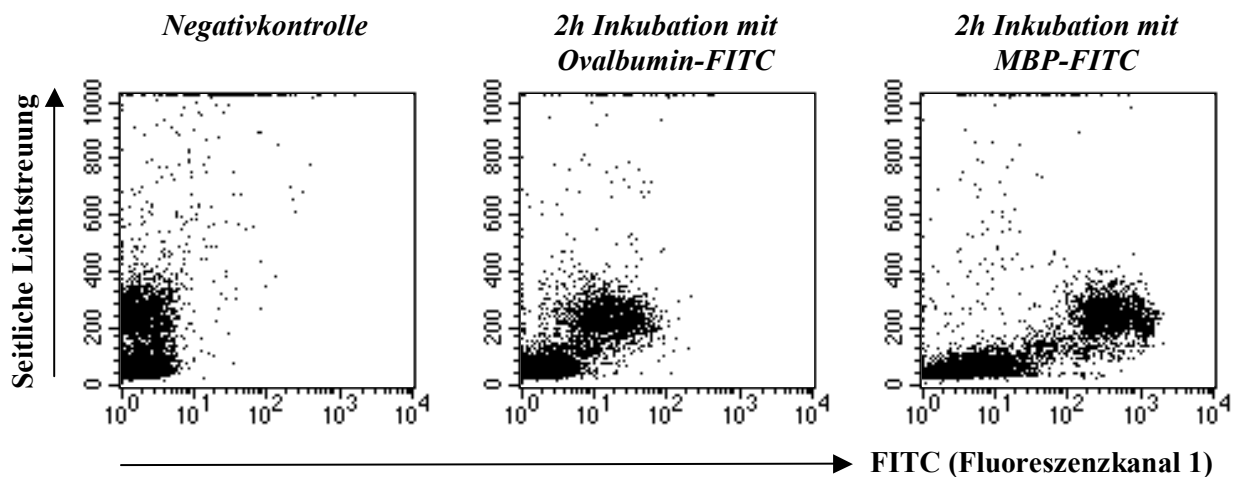


Abbildung 4-8: Nachweis der MBP-Aufnahme durch APC des peripheren Blutes. MBP bzw. Ovalbumin wurden an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt und anschließend zur zweistündigen Stimulation von PBMC verwendet. Durch die seitliche Lichtstreuung (y-Achse) lassen sich Monozyten anhand ihrer höheren Granularität von Lymphozyten unterscheiden. Die Monozytenpopulation zeigt nach Inkubation mit FITC-markiertem MBP bzw. Ovalbumin eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im ersten Fluoreszenzkanal.

4.4.2 Restimulation einer MBP-spezifischen T-Zelllinie

Während der in 4.4.1 beschriebene Versuch nur die MBP-Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen untersucht, besteht die Möglichkeit, auch die Prozessierung und Präsentation von MBP in MHC-Klasse-II-Molekülen nachzuweisen. Hierzu wurde eine MBP-spezifische T-Zelllinie, die aus einer gesunden Spenderin gewonnen worden war, mit MBP restimuliert. Als antigenpräsentierende Zellen (APC) wurden autologe, mit Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDA-SE) fluoreszenzmarkierte PBMC zugegeben. Die MBP-spezifischen T-Zellen können MBP nur erkennen und dadurch zur Zytokinproduktion angeregt werden, wenn das Protein zuvor von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und präsentiert wurde. Nach sechs Stunden Inkubationszeit mit Zugabe von Brefeldin A nach zwei Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD69 und IFN γ gefärbt. Die Analysefenster in Abbildung 4-9 beschränken sich auf die Zellen der T-Zelllinie, die nicht mit CFDA-SE markiert waren. Gezeigt sind die IFN γ - und CD69-Expression in der Negativkontrolle, der Stimulation mit MBP und der Positivkontrolle (Stimulation mit dem Mitogen PMA-Ionomycin). Nach MBP-Stimulation exprimierten nahezu alle Zellen den Aktivierungsmarker CD69, 32,28% exprimierten IFN γ .

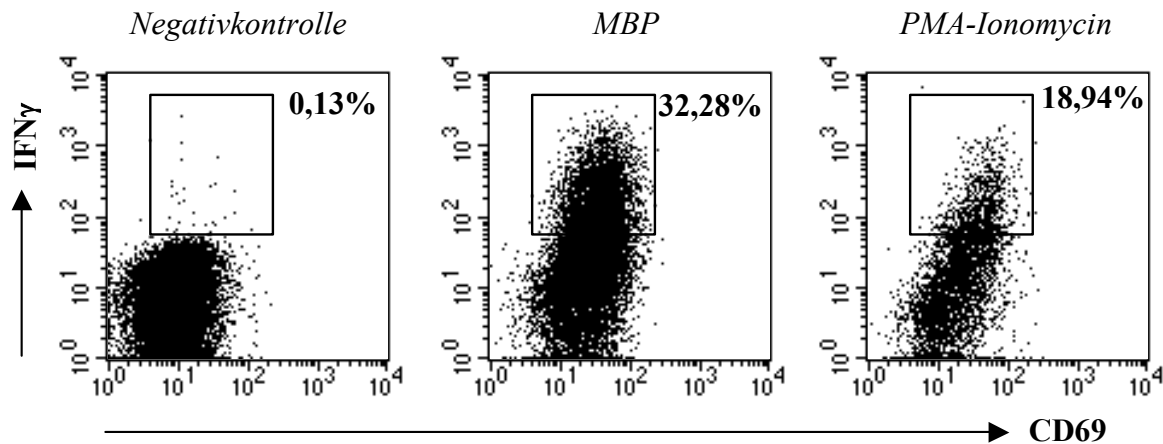


Abbildung 4-9: Restimulation einer MBP-spezifischen CD4⁺-Zelllinie. Autologe PBMC wurden mit CFDA markiert und als APC zur sechsstündigen Stimulation einer MBP-spezifischen T-Zelllinie mit MBP zugegeben. Brefeldin A wurde nach zwei Stunden hinzugefügt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Oberflächenantigene CD4 und CD69 sowie intrazellulär IFN γ gefärbt. Gezeigt sind die CFDA⁺ Zellen der T-Zelllinie, dargestellt sind in der Negativkontrolle und nach MBP-Stimulation die CD4⁺-Zellen, nach PMA-Ionomycin-Stimulation wurden aufgrund der CD4-Downregulation die CD8⁺ Zellen analysiert. Nach MBP-Stimulation exprimierten 32,28% der Zellen IFN γ , fast alle der T-Helferzellen sind jedoch aktiviert (CD69⁺).

4.4.3 Bestimmung der optimalen Stimulationskonzentration von MBP

Durch Titration der MBP-Konzentration bei der Stimulation der MBP-spezifischen T-Zelllinie wurde die optimale Stimulationskonzentration ermittelt. Getestet wurden die Konzentrationen 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ und 200 $\mu\text{g/ml}$. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ wurde die höchste Frequenz zytokinbildender T-Helferzellen erreicht (Abb. 4-10).

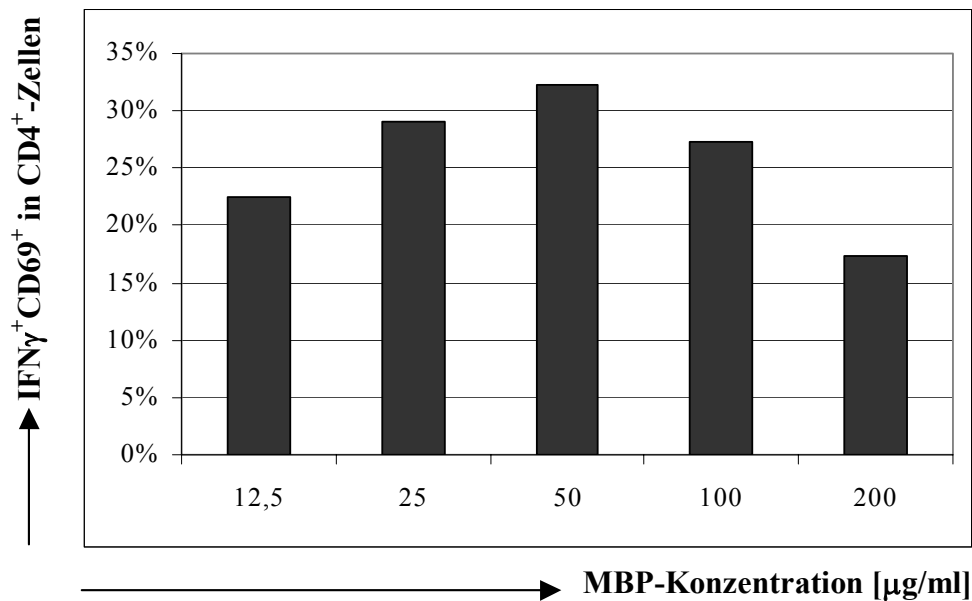


Abbildung 4-10: Titration der optimalen Stimulationskonzentration von MBP. Eine MBP-spezifische CD4⁺-Zelllinie wurde mit verschiedenen MBP-Konzentrationen restimuliert. Eine maximale Frequenz IFNγ-exprimierender T-Helferzellen fand sich bei einer Konzentration von 50µg/ml.

4.5 Vergleich der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten T-Helferzellen bei gesunden Probanden und MS-Patienten

Es wurden Vollblutproben von 25 gesunden Probanden und 34 MS-Patienten mit den Antigenen TT, CMV und MBP *in vitro* stimuliert. Als Positivkontrolle wurde je eine Probe mit dem bakteriellen Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimuliert, das T-Zellen polyklonal durch direkte Bindung an die Vβ-Kette des TCR und MHC-Klasse-II-Moleküle der APC aktiviert. Alle der untersuchten Personen zeigten nach SEB-Stimulation reaktive zytokin-exprimierende T-Helferzellen.

Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Zelloberfläche CD4 und der Aktivierungsmarker CD69 sowie intrazellulär die Zytokine IFNγ und TNFα angefärbt. Ausgewertet wurden die Frequenzen der aktivierten IFNγ- bzw. TNFα-bildenden CD4⁺-Zellen. Bei Mehrfachuntersuchungen von Proben einer Person zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die

arithmetischen Mittelwerte dieser Messungen als Einzelwert in die statistische Auswertung einbezogen.

4.5.1 Untersuchte gesunde Probanden

Es wurden 25 gesunde Probanden im Alter von 24 bis 41 Jahren mit einem mittleren Alter von 32,11 Jahren untersucht. Elf der Probanden waren weiblich, 14 männlich.

Mittels Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen konnten bei Gesunden TT- und CMV-reaktive T-Helferzellen detektiert werden, nicht jedoch MBP-spezifische CD4⁺-Zellen.

Untersucht wurden bei allen Probanden die Frequenzen der aktivierten IFN γ - bzw. TNF α -exprimierenden Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen. In Tabelle 4-4 sind die Medianwerte der Frequenzen zytokinexprimierender CD4⁺-Zellen sowie die jeweils dazugehörige Standardabweichung dargestellt. Als Lagemaß wurde der Medianwert bestimmt, um Ausreißer weniger stark in die Bewertung einzubeziehen.

Tabelle 4-4: Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung nach Antigenstimulation bei 25 untersuchten gesunden Probanden. Angegeben sind die Anzahl der Probanden, bei denen antigenreaktive T-Helferzellen detektiert wurden, sowie die Medianwerte +/- Standardabweichungen der Frequenzen zytokinexprimierender CD4⁺-Zellen. Diese sind sowohl für die Gesamtheit der Proben angegeben, als auch für diejenigen Proben, bei denen antigenspezifische CD4⁺-Zellen nachgewiesen wurden.

		Negativ- kontrolle	TT	CMV	MBP
Anzahl antigenreaktiver Proben/ Anzahl der untersuchten Probanden		0/25	24/25	11/24	0/25
Frequenz IFNγ⁺CD69⁺	gesamt	0,00% +/- 0,00%	0,03% +/- 0,07%	0,01% +/- 0,41%	0,00% +/- 0,00%
	antigenreaktive Proben		0,04% +/- 0,07%	0,43% +/- 0,46%	
Frequenz TNFα⁺CD69⁺	gesamt	0,01% +/- 0,01%	0,14% +/- 0,17%	0,03% +/- 0,44%	0,01% +/- 0,01%
	antigenreaktive Proben		0,15% +/- 0,17%	0,45% +/- 0,48%	

Es sollen hier beispielhaft die Punktdiagramme der durchflußzytometrischen Messungen von Vollblutproben eines gesunden Probanden nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen gezeigt werden (Abb. 4-11).

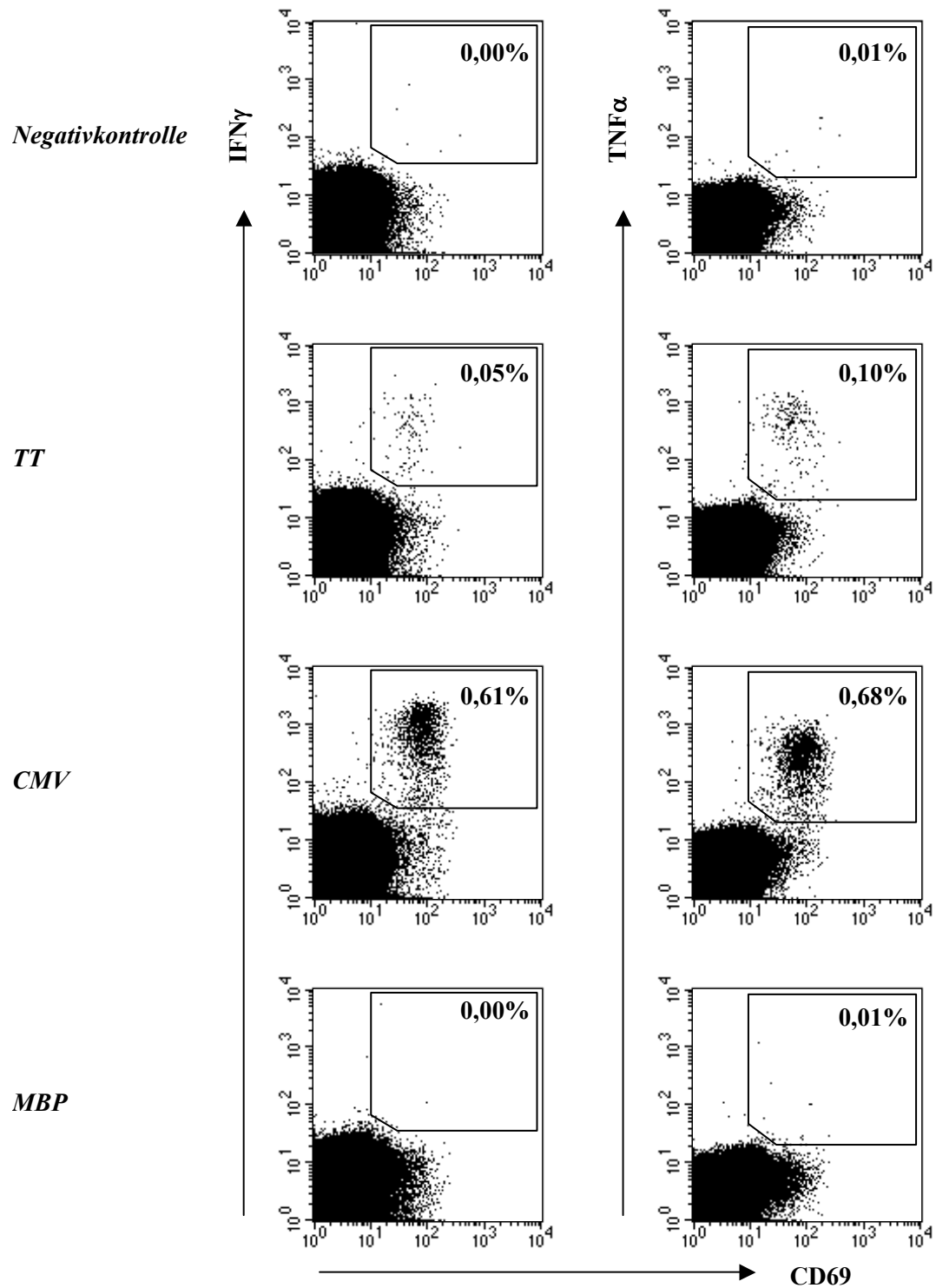


Abbildung 4-11: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen bei einem gesunden Probanden. Vollblut wurde sechs Stunden mit den Antigenen TT, CMV und MBP stimuliert. Brefeldin A wurde nach zwei Stunden zugegeben. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD4 und CD69 gefärbt, intrazellulär die Zytokine IFN γ und TNF α . Die hier dargestellten Punktdiagramme beschränken sich auf CD4⁺-Lymphozyten.

4.5.2 Untersuchte MS-Patienten

Insgesamt wurden Blutproben von 34 Multiple Sklerose Patienten mit gesicherter Diagnose gemäß der Poser-Kriterien (Poser et al., 1983) untersucht. Das Alter der Patienten betrug im Mittel 35,82 Jahre, der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 20, der älteste 59 Jahre alt. 25 der Patienten waren weiblich, neun männlich. Die klinischen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5: Klinische Charakteristika der 34 untersuchten MS-Patienten.

Schub zum Zeitpunkt der Blutentnahme	30 stabil 4 im Schub
Verlaufsform der MS	29 Rezidivierend Remittierende MS (RRMS) 3 Sekundär Progressive MS (SPMS) 2 Primär Progressive MS (PPMS)
Dauer der Erkrankung (Erstmanifestation vor ... Jahren)	Arithmetisches Mittel = 4,85 Jahre Standardabweichung = 5,66 Jahre
Aktivität der Erkrankung (Anzahl der Schübe in den letzten 2 Jahren)	Arithmetisches Mittel = 1,88 Standardabweichung = 1,14
Ausmaß der MS-bedingten Behinderung: Expanded disability status scale (EDSS) (Kurtzke, 1983)	Arithmetisches Mittel = 2,01 Standardabweichung = 1,71
Medikation	18 Keine Medikation 9 Interferon β -Präparat 2 Copolymer I 5 Immunsuppressive Therapie

Auch bei MS-Patienten waren mittels Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen keine MBP-spezifischen CD4⁺-Zellen nachweisbar, während TT- und CMV-reaktive T-Helferzellen detektiert wurden.

Analog zur Verfahrensweise bei den gesunden Probanden wurden auch bei MS-Patienten die Frequenzen der zytokinexprimierenden T-Helferzellen nach Antigenstimulation untersucht. In Tabelle 4-6 sind die Medianwerte und die Standardabweichungen der Frequenzen zytokinbildender Zellen angegeben.

Tabelle 4-6: Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung nach Antigenstimulation bei 34 untersuchten MS-Patienten. Angegeben sind die Anzahl der Patienten, bei denen antigenreaktive T-Helferzellen detektiert wurden, sowie die Medianwerte und +/- Standardabweichungen der Frequenzen zytokinexprimierender CD4+-Zellen. Diese sind sowohl für die Gesamtheit der Proben angegeben, als auch für diejenigen Proben, bei denen antigenspezifische CD4+-Zellen nachgewiesen wurden.

		Negativ- kontrolle	TT	CMV	MBP
Anzahl antigenreaktiver Proben/ Anzahl der untersuchten Probanden		0/34	28/34	16/31	0/33
Frequenz IFNγ⁺CD69⁺	gesamt	0,00% +/- 0,00%	0,02% +/- 0,03%	0,01% +/- 0,21%	0,00% +/- 0,00%
	antigenreaktive Proben		0,03% +/- 0,04%	0,30% +/- 0,21%	
Frequenz TNFα⁺CD69⁺	gesamt	0,01% +/- 0,01%	0,10% +/- 0,09%	0,02% +/- 0,24%	0,01% +/- 0,01%
	antigenreaktive Proben		0,14% +/- 0,09%	0,37% +/- 0,24%	

Beispielhaft seien hier die Punktdiagramme der durchflußzytometrischen Messungen von Blutproben eines MS-Patienten nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen gezeigt (Abb. 4-12).

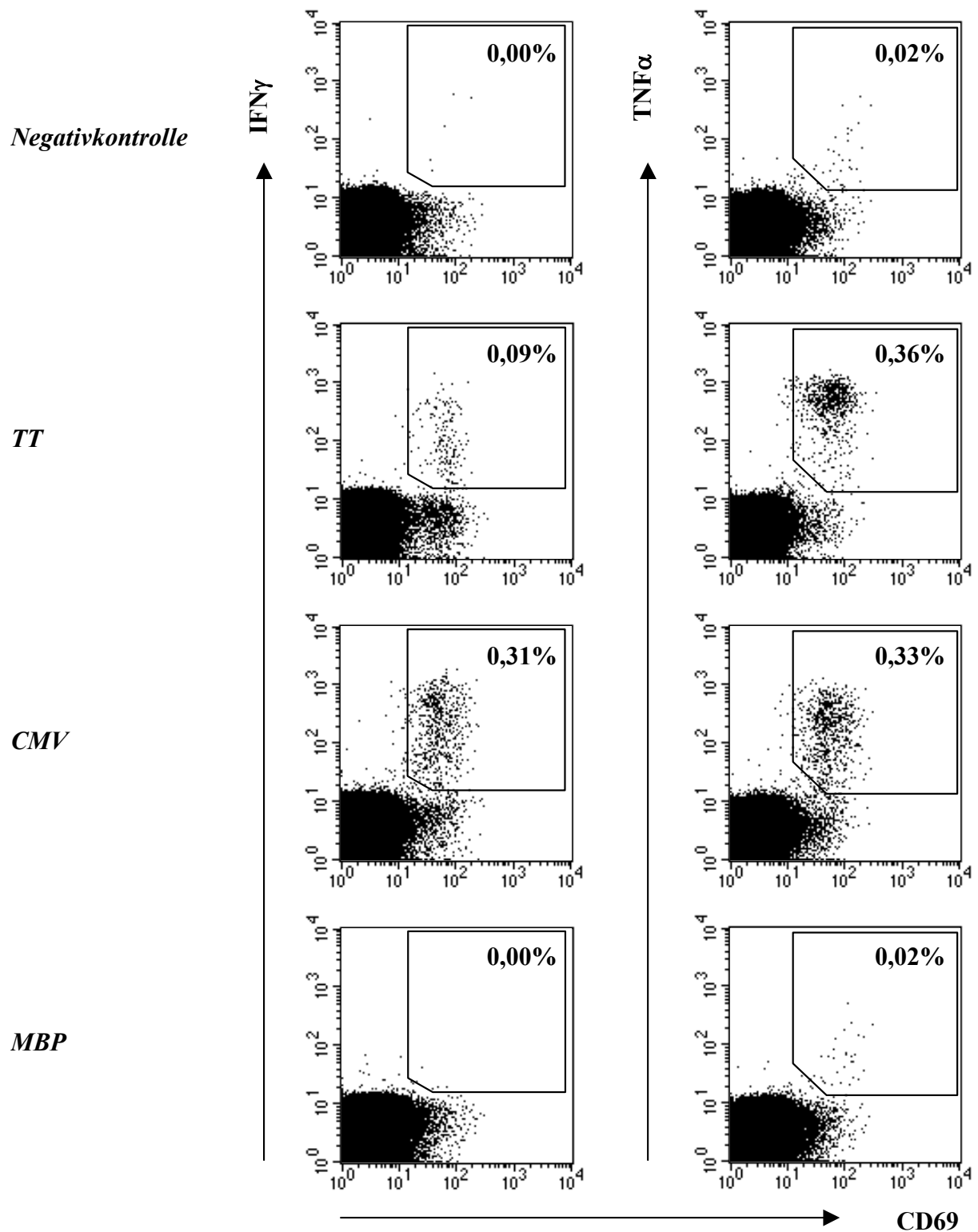


Abbildung. 4-12: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen bei einem MS-Patienten. Vollblut wurde sechs Stunden mit den Antigenen TT, CMV und MBP stimuliert. Brefeldin A wurde nach zwei Stunden zugegeben. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD4 und CD69 gefärbt, intrazellulär die Zytokine IFN γ und TNF α . Die hier dargestellten Punktdiagramme beschränken sich auf CD4⁺-Lymphozyten.

4.5.3 Statistischer Vergleich der antigenspezifischen T-Helferzellantwort auf verschiedene Antigene bei Gesunden und MS-Patienten

Die Zytokinantwort auf die Antigene TT, CMV und MBP unterscheidet sich nicht zwischen MS-Patienten und Gesunden.

Die erste Fragestellung bezog sich auf den Vergleich der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen nach Antigenstimulation bei allen untersuchten Gesunden und allen MS-Patienten. Der Chi-Quadrat-Test ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der gesunden Probanden bzw. Patienten, bei denen antigenreaktive Zellen gegen TT, CMV und MBP nachgewiesen werden konnten ($p > 0,05$). Mit dem Mann-Whitney-Test wurden die Frequenzen der zytokinexprimierenden Zellen nach Stimulation mit den Antigenen TT, CMV und MBP verglichen. Es wurde kein Unterschied der detektierten Frequenzen zytokinexprimierender $CD4^+$ -Zellen zwischen gesunden Probanden und MS-Patienten gefunden ($p > 0,05$).

Klinische Subgruppen der MS-Patienten weisen statistische Unterschiede in der T-Helferzellantwort auf die Antigene TT und CMV auf.

Anschließend wurde die Gruppe der MS-Patienten anhand der in Tabelle 4-5 aufgeführten klinischen Charakteristika weiter unterteilt. Die Subgruppierungen anhand der Parameter Krankheitsaktivität, Krankheitsdauer und EDSS-Wert ergaben keine signifikanten Unterschiede dieser Subgruppen zur Gruppe der gesunden Probanden.

Patienten mit chronisch progressiven MS-Formen (SPMS, PPMS) zeigten im Vergleich zu Gesunden bzw. RRMS-Patienten geringere Frequenzen zytokinexprimierender Zellen nach TT-Stimulation. Bei Patienten mit sekundär progredienter MS wurden tendenziell weniger TT-reaktive $IFN\gamma$ -bildende $CD4^+$ -Zellen nachgewiesen ($p = 0,042$) als bei Gesunden. Bei PPMS-Patienten fanden sich tendenziell weniger $IFN\gamma$ - und signifikant weniger $TNF\alpha$ -exprimierende Zellen als bei Gesunden ($p = 0,011$ bzw. $p = 0,006$). Ebenso zeigten PPMS-Patienten tendenziell geringere Frequenzen TT-reaktiver $TNF\alpha$ -exprimierender T-Helferzellen als RRMS-Patienten ($p = 0,017$). Bei immunsupprimierten MS-Patienten wurden signifikant geringere Frequenzen zytokinbildender T-Helferzellen nach TT-Stimulation nachgewiesen als bei gesunden Probanden ($IFN\gamma$: $p = 0,001$; $TNF\alpha$: $p = 0,004$).

Die Frequenz zytokinbildender T-Helferzellen nach CMV-Stimulation war bei MS-Patienten im Schub tendenziell höher als bei Patienten in Remission ($IFN\gamma$: $p = 0,024$; $TNF\alpha$: $p = 0,033$).

4.6 Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen mit dem IFN γ -Sekretionsassay

Nachdem mittels der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen keine MBP-reaktiven T-Helferzellen bei MS-Patienten und Gesunden nachgewiesen werden konnten, wurde der sensitivere IFN γ -Sekretionsassay eingesetzt, um bei MS-Patienten autoreaktive Zellen zu detektieren. Dazu wurden jeweils mindestens 1×10^7 PBMC eines MS-Patienten mit MBP stimuliert und ebenso viele Zellen als Negativkontrolle ohne Antigen inkubiert. Das entspricht ca. der zehnfachen Menge an Zellen, wie sie in einem Milliliter Vollblut vorliegen, der zur Stimulation für die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen verwendet wird. Bei der Hälfte der Patienten war aus vorherigen intrazellulären Färbungen das Vorliegen TT-spezifischer T-Helferzellen bekannt, so dass zusätzlich als Positivkontrolle eine Probe mit TT stimuliert wurde.

4.6.1 Untersuchte MS-Patienten

Insgesamt wurden acht MS Patienten untersucht, sechs waren weiblich, zwei männlich. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 22, der älteste 51 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 36,14 Jahre. Tabelle 4-7 zeigt die klinischen Charakteristika.

Tabelle 4-7: Klinische Charakteristika der Patienten, die mit dem IFN γ -Sekretionsassay untersucht wurden.

Schub zum Zeitpunkt der Blutentnahme	6 stabil, 2 im Schub
Verlaufsform der MS	8 Rezidivierend Remittierende MS (RRMS)
Dauer der Erkrankung (Erstmanifestation vor ... Jahren)	Arithmetisches Mittel = 3,56 Jahre Standardabweichung = 2,73 Jahre
Aktivität der Erkrankung (Anzahl der Schübe in den letzten 2 Jahren)	Arithmetisches Mittel = 2,13 Standardabweichung = 0,93
Expanded disability status scale (EDSS) (Kurtzke JF, 1983)	Arithmetisches Mittel = 2,06 Standardabweichung = 1,07
Medikation	4 Keine Medikation 3 Interferon β -Präparat 1 Immunsuppressive Therapie

Die Zellzahl pro Stimulationsansatz reichte von $1,17 \times 10^7$ bis 3×10^7 PBMC.

4.6.2 Nachweis geringer Frequenzen MBP-spezifischer T-Helferzellen

Es wurde für alle antigenstimulierten Proben der Stimulationsindex (SI) berechnet. Dieser errechnet sich aus den nach Antigenstimulation angereicherten $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ -Zellen geteilt durch die in der Negativkontrolle angereicherten Zellen. Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, beschränkte sich die Berechnung auf diejenigen Proben, bei denen die Zahl der angereicherten Zellen über 20 lag. In Tabelle 4-8 sind alle berechneten Stimulationsindizes dargestellt.

Tabelle 4-8: Ergebnisse des $IFN\gamma$ -Sekretionsassays: Anzahl der angereicherten Zellen und Stimulationsindizes.

	Negativkontrolle	MBP-Stimulation		TT-Stimulation	
	angereicherte Zellen	angereicherte Zellen	SI	angereicherte Zellen	SI
Patient 1	5	15			
Patient 2	27	24	0,89		
Patient 3	27	42	1,56	1084	40,15
Patient 4	9	6			
Patient 5	2	9			
Patient 6	21	48	2,29	4202	200,10
Patient 7	40	174	4,35	258	6,45
Patient 8	24	36	1,50	272	11,33

Bei sieben der acht Patienten konnten keine MBP-spezifischen T-Helferzellen nachgewiesen werden, während bei Patientin 7 MBP-reaktive $IFN\gamma$ -sezernierende $CD4^+$ -Zellen gezeigt werden konnten. Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 34 Jahre alt und befand sich nicht im Schub. Die RRMS war bei ihr vor drei Jahren diagnostiziert worden, sie hatte in den letzten zwei Jahren zwei Schübe gehabt und wurde mit $IFN\beta$ therapiert. Bei dieser Patientin waren pro Ansatz 3×10^7 PBMC stimuliert worden. Geht man davon aus, dass etwa 27% dieser Zellen letztlich in der Analyse rückgewonnen wurden (vgl. Kap. 4.2.2), so errechnet sich eine Ausgangsfrequenz von ca. $2,15 \times 10^{-5}$ MBP-spezifischen T-Helferzellen in PBMC.

Bei allen vier Patienten, bei denen schon zuvor TT-spezifische T-Helferzellen mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung nachgewiesen worden waren, konnten diese auch im $IFN\gamma$ -Sekretionsassay und anschließender magnetischer Anreicherung detektiert werden.

Um zu demonstrieren, inwieweit die Ergebnisse des IFN γ -Sekretionsassays die der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen widerspiegeln, sollen hier die Daten zweier Patienten gezeigt werden.

In Abbildung 4-13 sind die Daten der einzigen Patientin, bei der MBP-spezifische Th1-Zellen detektiert wurden, gezeigt. Die intrazelluläre Färbung zeigte nach MBP-Stimulation zwar erhöhte Frequenzen IFN γ - und TNF α -exprimierender Zellen, die jedoch unterhalb des „Cut-off point“ lagen. Nach magnetischer Anreicherung hingegen war eine MBP-spezifische Population klar abgrenzbar. Nach TT-Stimulation wurden mit der intrazellulären Färbung TNF α -exprimierende Zellen gezeigt. Diese wurden als antigenspezifisch bewertet, da die Differenz der Frequenz zur Negativkontrolle mehr als 0,02% betrug. Obwohl mit der intrazellulären Färbung keine IFN γ -exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnten, waren diese Zellen nach magnetischer Anreicherung detektierbar.

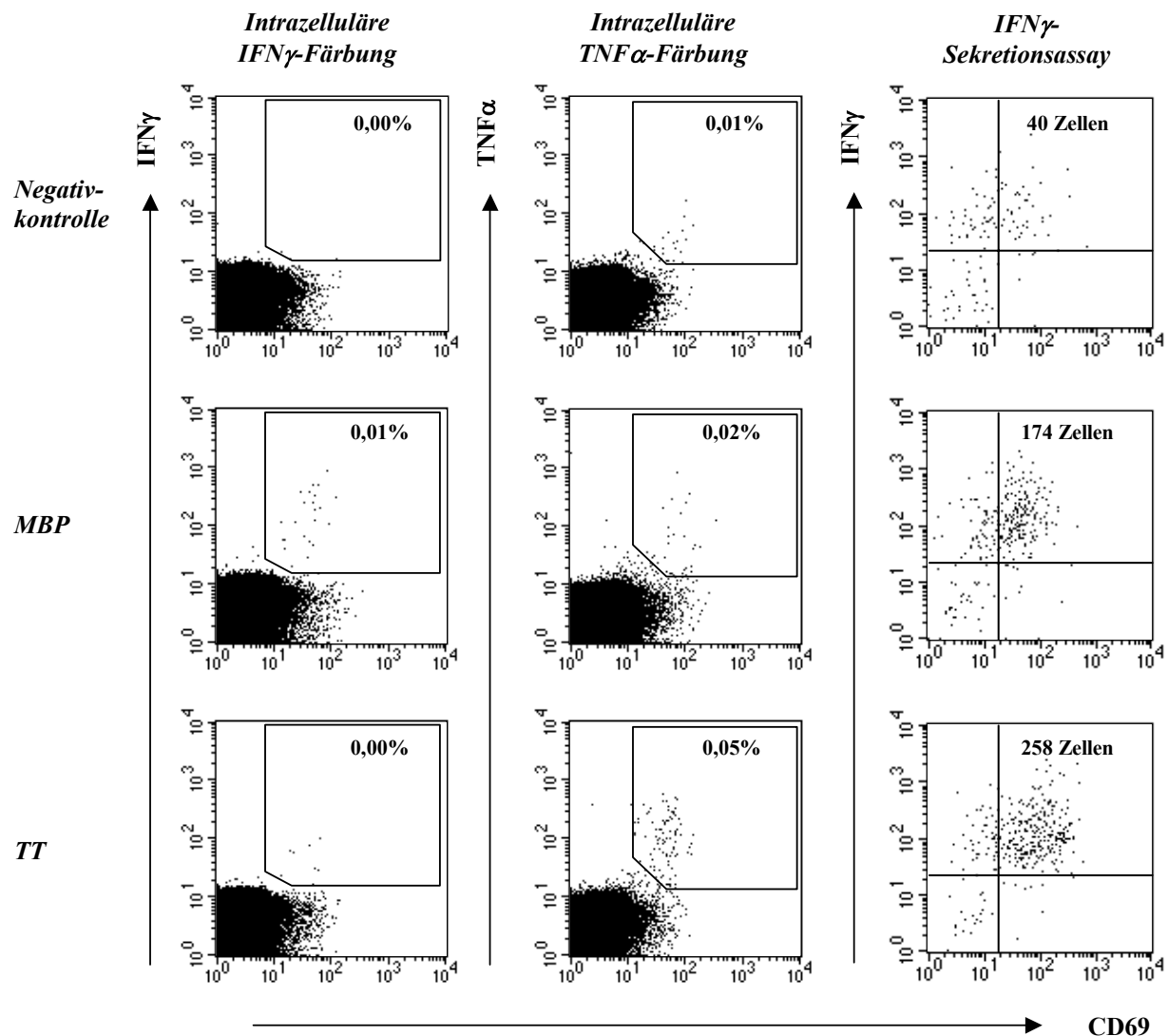


Abbildung 4-13: Vergleich der intrazellulären Zytokinfärbung mit dem IFN γ -Sekretionsassay mit nachfolgender magnetischer Anreicherung nach sechsständiger Stimulation mit den Antigenen MBP und TT bei einer MS-Patientin. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde 1 ml Vollblut je Ansatz stimuliert, für den Sekretionsassay 3×10^7 PBMC je Ansatz. Dargestellt sind alle CD4⁺-Lymphozyten. Mit der intrazellulären Zytokinfärbung konnten keine MBP-spezifischen T-Helferzellen nachgewiesen werden, während diese mit dem IFN γ -Sekretionsassay und nachfolgender magnetischer Anreicherung gezeigt werden konnten. Als Positivkontrolle konnten sowohl mit der intrazellulären Zytokinfärbung als auch mit dem IFN γ -Sekretionsassay TT-spezifische CD4⁺-Zellen geringer Frequenzen detektiert werden.

Abbildung 4-14 zeigt die Daten einer immunsupprimierten Patientin, bei der weder mit der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen, noch im IFN γ -Sekretionsassay MBP-spezifische T-Helferzellen nachgewiesen werden konnten. Bei dieser Patientin wurden nach TT-Stimulation sowohl in der intrazellulären Färbung als auch im IFN γ -Sekretionsassay antigenspezifische Zellen detektiert. Auch hier konnte durch die Anreicherung nach dem

Sekretionsassay eine Population IFN γ -exprimierender antigenspezifischer Zellen sichtbar gemacht werden, deren Frequenz unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Analyse antigenreaktiver IFN γ -Expression in fixierten Zellen lag.

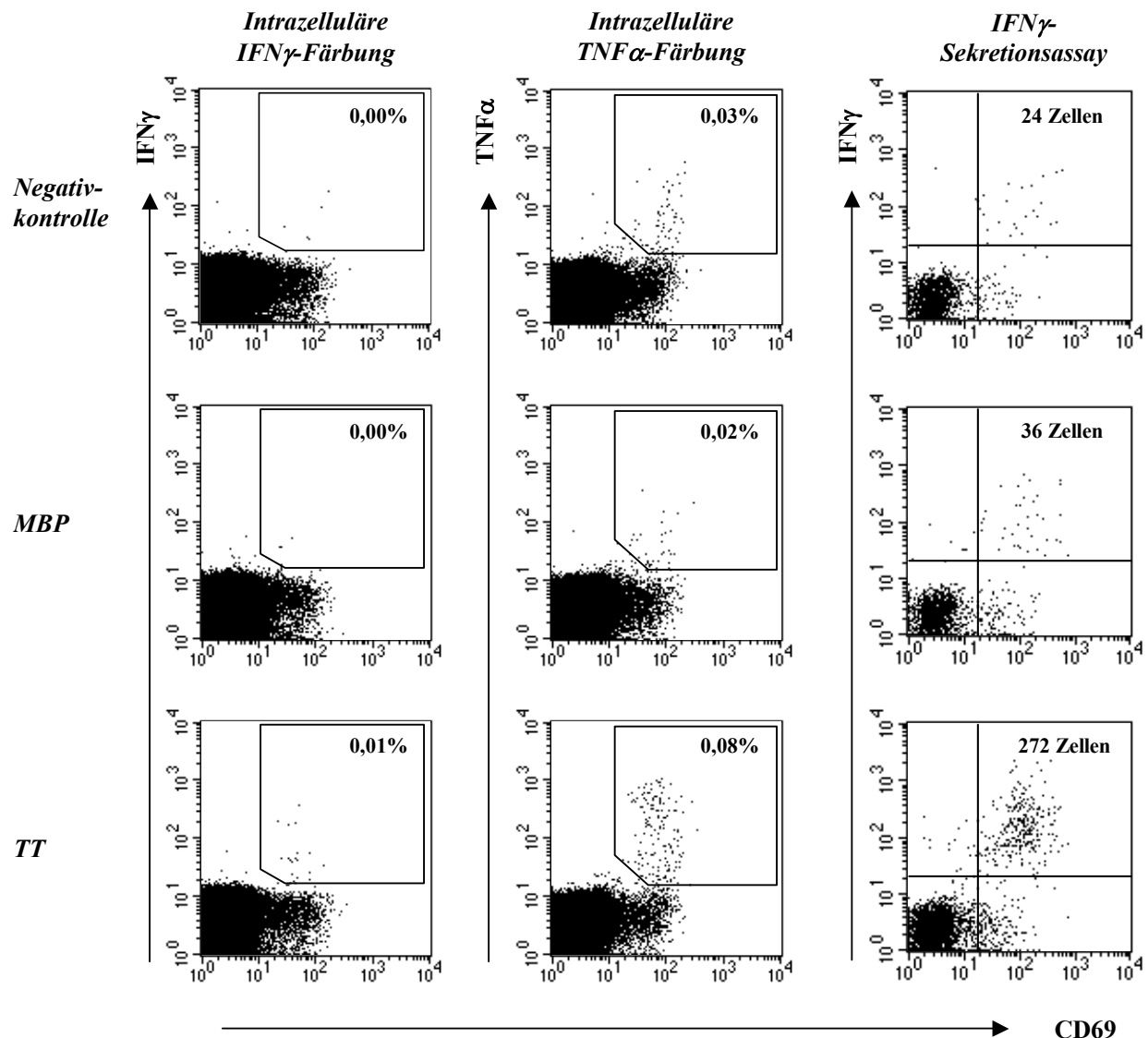


Abbildung 4-14: Vergleich der intrazellulären Zytokinfärbung mit dem IFN γ -Sekretionsassay mit nachfolgender magnetischer Anreicherung nach sechsständiger Stimulation mit den Antigenen MBP und TT bei einer MS-Patientin. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde 1 ml Vollblut je Ansatz stimuliert, für den Sekretionsassay $1,2 \times 10^7$ PBMC je Ansatz. Dargestellt sind CD4⁺-Lymphozyten. Nach MBP-Stimulation konnten keine antigenspezifischen T-Helferzellen nachgewiesen werden, während als Positivkontrolle TT-spezifische CD4⁺-Zellen sowohl mit der intrazellulären Zytokinfärbung als auch mit dem IFN γ -Sekretionsassay und nachfolgender magnetischer Anreicherung nachgewiesen werden konnten.

4.7 Untersuchung von Liquorzellen

In den bisher beschriebenen Versuchen wurden Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten und gesunden Probanden untersucht. Es stellte sich jedoch die Frage, ob Zellen, die für die Pathogenese der Multiplen Sklerose relevant sein können, nicht in viel höheren Frequenzen „am Ort des Geschehens“, d.h. im ZNS bzw. im das ZNS umgebenden Liquor cerebrospinalis, vorliegen. Im Folgenden wurden deshalb Zellen aus dem Liquor von MS-Patienten untersucht.

Durch Lumbalpunktion wurden je 10 ml Liquor von MS-Patienten gewonnen, aus denen zwischen $1,1 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^5$ Liquorzellen isoliert werden konnten. Zeitgleich wurden autologe PBMC isoliert und mit CFDA-SE fluoreszenzmarkiert. Die Liquorzellen wurden zu den PBMC zugegeben und mit MBP stimuliert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit dem Superantigen SEB stimuliert, das T-Zellen polyklonal durch Quervernetzung von TCR und MHC-Molekülen stimuliert. Nach SEB-Stimulation ist eine Frequenz von etwa 1% aktivierten T-Helferzellen zu erwarten. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Antigen inkubiert, sowie PBMC ohne Zugabe von Liquorzellen stimuliert. Nach anschließender Fixierung und Permeabilisierung wurden die Oberflächenantigene CD4 und CD69 gefärbt, sowie intrazellulär das Zytokin IFN γ . Untersucht wurden drei Patienten und eine Kontrollperson mit einer anderen neurologischen Erkrankung. Tabelle 4-9 zeigt die klinischen Charakteristika.

Tabelle 4-9: Klinische Charakteristika der untersuchten Patienten.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Kontrolle 1
Geschlecht	weiblich	männlich	weiblich	weiblich
Alter [Jahre]	37	26	28	35
Schub zum Zeitpunkt der Blutentnahme	nein	ja	ja	-
Erstmanifestation vor ... Jahren	3 Jahre	1 Woche	2 Wochen	-
Anzahl der Schübe in den letzten 2 Jahren	2	1	1	-
Expanded disability status scale (EDSS)	2,0	1,0	1,0	-
Medikation	keine	keine	keine	keine

Bei allen drei Patienten konnten nach SEB-Stimulation CD69⁺IFN γ ⁺CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden. Auffällig war eine durchschnittlich ca. vierfach erhöhte Frequenz an IFN γ -exprimierenden CD4⁺-Zellen in Liquorzellen im Vergleich zu PBMC. Bei keinem der

untersuchten Patienten konnten nach Stimulation der Liquorzellen mit MBP $\text{IFN}\gamma^+\text{CD69}^+\text{CD4}^+$ -Zellen nachgewiesen werden.

Abbildung 4-15 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von Patientin 3.

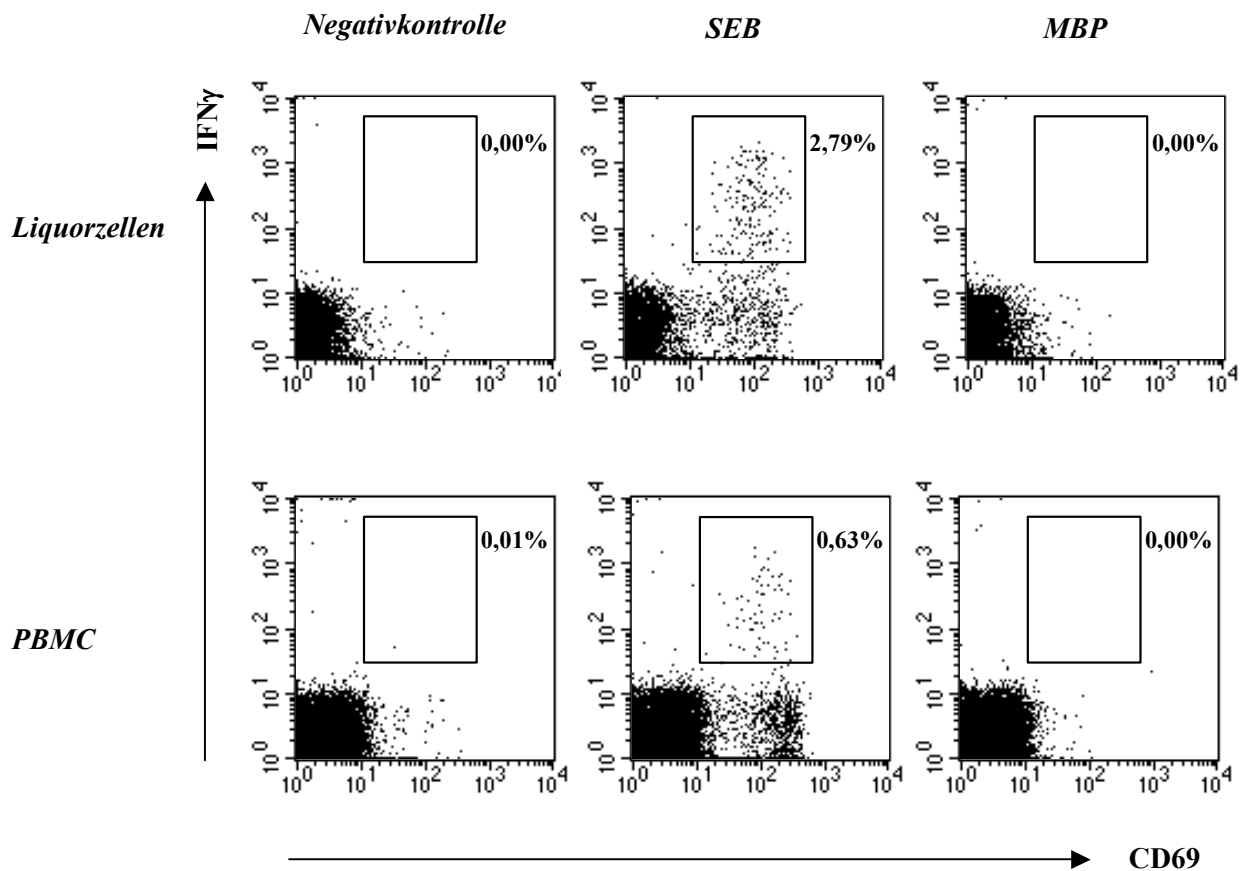


Abbildung 4-15: Stimulation von Liquorzellen einer MS-Patientin mit den Antigenen SEB und MBP. Aus 10 ml Liquor wurden Zellen isoliert und in Anwesenheit von autologen, CFDA-markierten PBMC sechs Stunden mit Antigen stimuliert, wobei nach zwei Stunden Brefeldin A zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Oberflächenmoleküle CD4 und CD69, sowie intrazellulär $\text{IFN}\gamma$ gefärbt. Die hier gezeigten Punktdiagramme beschränken sich in der oberen Reihe auf $\text{CD4}^+\text{CFDA}^-$ -Liquorzellen, in der unteren Reihe auf $\text{CD4}^+\text{CFDA}^+$ -Zellen des peripheren Blutes. Nach Stimulation mit SEB exprimierten im Liquor 2,79% der CD4^+ -Zellen $\text{IFN}\gamma$, während nur 0,63% der CD4^+ -Zellen des peripheren Blutes das Zytokin exprimierten. Nach MBP-Stimulation konnten keine aktivierten $\text{IFN}\gamma$ -exprimierenden CD4^+ -Zellen detektiert werden.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals MBP-reaktive T-Helferzellen bei MS-Patienten und Gesunden direkt *ex vivo* nachzuweisen. Zellen des peripheren Blutes bzw. Liquorzellen wurden sechs Stunden *in vitro* durch Antigenzugabe stimuliert. Man macht sich dabei zunutze, dass von außen zugegebenes Antigen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) des peripheren Blutes innerhalb weniger Stunden effektiv aufgenommen, prozessiert und als Peptidfragmente überwiegend in MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird. Die Antigenspezifität von T-Helferzellen wurde anhand reaktiver Zytokinexpression nachgewiesen. Es wurden zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von Zytokinexpression nach Antigenstimulation benutzt, die unterschiedliche Sensitivitäten aufwiesen. Die erste Methode, die intrazelluläre Zytokinfärbung, erfordert die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Bei der zweiten Methode dagegen, dem IFN γ -Sekretionsassay, wird sezerniertes Zytokin mit Hilfe einer Fangmatrix auf der Zelloberfläche gebunden. Die Zellen müssen dafür nicht fixiert werden und können anschließend magnetisch angereichert werden.

5.1 Optimierung der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung

Die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen wurde als Methode zur Detektion antigenspezifischer T-Helferzellen in den letzten Jahren ausführlich etabliert. Waldrop et al. zeigten 1997 die Abhängigkeit der T-Zellaktivierung von der Peptidpräsentation in MHC-Klasse-II-Molekülen, sowie die Zugehörigkeit der zytokinexprimierenden T-Zellen zum Gedächtnispool (CD45RO⁺). Die Korrelation der Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung mit der Seroreaktivität wurde 1998 von Suni et al. demonstriert. Nomura et al. untersuchten 2000 die Kinetiken der Expression verschiedener Zytokine und bestätigten die optimale Stimulationszeit von sechs Stunden. Bisher wurden mit dieser Methode T-Helferzellen untersucht, die für virale Antigene (CMV) spezifisch sind. Die Frequenzen dieser Zellen beliefen sich auf 10^{-4} bis 10^{-3} in PBMC (Waldrop et al., 1997), während die zu erwartenden Frequenzen autoreaktiver Zellen mit ca. 10^{-4} bis 10^{-5} in PBMC weit geringer sind (Eming et al., 2000). Die entscheidende Frage ist also, ob mit der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen nach sechsstündiger Antigenstimulation auch niederfrequente autoantigenspezifische Zellen nachweisbar sind. Es wurden zunächst einige ausgewählte Aspekte dieser Methode näher untersucht.

Die Stimulation von Vollblut ergab verglichen mit der Stimulation von PBMC höhere Frequenzen zytokinexprimierender Zellen. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Waldrop et al. 1997 und ist ein Hinweis dafür, dass die T-Zellstimulation durch viele im weitesten Sinne kostimulatorische Signale reguliert und verstärkt wird, bei denen auch Serumbestandteile eine Rolle spielen könnten. Die erhöhte Zytokinexpression in der Negativkontrolle weist auf eine unspezifische Stimulation während der PBMC-Aufarbeitung hin und ist ein weiteres Argument für die Verwendung von Vollblut. Dies unterstützt die Vorstellung, mit der Vollblutstimulation durch direkten *ex vivo* Nachweis antigenspezifischer Zellen möglichst nahe an den *in vivo* Verhältnissen zu bleiben und die *in vitro* Manipulationen so gering als möglich zu halten.

Des weiteren wurden aus Mehrfachmessungen die Variabilitätskoeffizienten als Maß der „Intra Assay Variabilität“ bestimmt. Die Ergebnisse von 5 bis 8,5% weisen auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode hin und stimmen ebenfalls mit den Literaturangaben (Waldrop et al., 1997; Nomura et al. 2000) überein.

In allen für diese Arbeit verwendeten Experimenten wurde eine Mindestzellzahl von 100 000 CD4⁺-Zellen analysiert, wobei die durchschnittlich untersuchten Zahlen bei 200 000 CD4⁺-Zellen lagen. Dies entspricht in etwa dem doppelten der in der Literatur (Waldrop et al., 1997; Nomura et al. 2000) angegebenen Mindestzellzahlen. Die Untersuchung einer hohen Anzahl von Zellen ist jedoch gerade bei den zu erwartenden sehr geringen Frequenzen autoreaktiver Zellen von großer Bedeutung.

In einer Verlaufsanalyse wurden die Schwankungen der T-Zellantwort auf verschiedene Antigene zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Innerhalb von zwei Monaten wurden Abweichungen von bis zu 50% des Mittelwertes gemessen. Es zeigte sich die Tendenz, dass sich die Zytokinexpression als Antwort auf die beiden Antigene TT und CMV bei einem Spender zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils in die gleiche Richtung, d.h. zu höheren oder niedrigeren Frequenzen hin, veränderte. Dies lässt vermuten, dass an einem bestimmten Zeitpunkt eine individuelle Tendenz zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Zytokinantwort besteht. Diese könnte auf Veränderungen der T-Zellen selbst oder anderer an der T-Zellaktivierung beteiligter Faktoren, wie zum Beispiel Makrophagen oder Serumkomponenten beruhen. Tageszeitliche Schwankungen können weitgehend ausgeschlossen werden, da die Blutabnahme in einem Zeitfenster von zwei Stunden erfolgte.

5.2 Der IFN γ -Sekretionsassay zum Nachweis lebender antigenspezifischer T-Helferzellen

Der IFN γ -Sekretionsassay erlaubt es, reaktive IFN γ -Sekretion in lebenden Zellen nachzuweisen und diese Zellen anschließend anzureichern bzw. zu isolieren. Dies bringt zwei entscheidende Vorteile gegenüber der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mit sich: Zum einen kann durch die Anreicherung antigenspezifischer Zellen die Sensitivität der Methode erhöht werden. Zum anderen können autoantigenspezifische T-Helferzellen isoliert, weiter charakterisiert und durch *in vitro* Manipulation therapeutisch nutzbar gemacht werden.

Die Detektion niederfrequenter Zellen bedarf der Untersuchung einer großen Zellzahl in der Ausgangslösung, um signifikante Populationen nachweisen zu können. Ohne Anreicherung ist der Grenzwert des untersuchten Materials ca. 1-2 ml Vollblut – für größere Zellmengen ist die durchflußzytometrische Analyse zu aufwendig. Durch die Anreicherung ist es möglich, größere Zellzahlen im Ausgangsmaterial zu untersuchen, da nur ein kleiner Teil der zu Beginn des Experimentes vorhandenen Zellen durchflußzytometrisch analysiert wird. Mit Hilfe des IFN γ -Sekretionsassays konnten je Ansatz ca. 10-20 ml Blut untersucht werden. Der limitierende Faktor war hier die Verfügbarkeit relativ großer Mengen Blut von Patienten, die ohnehin durch häufige Blutabnahmen belastet sind.

Brosterhus et al. beschrieben 1999 die gute Reproduzierbarkeit und Spezifität dieser Methode. In dieser Arbeit wurde die optimale Stimulationszeit untersucht. Nach sechs Stunden wiesen IFN γ -sezernierende CD4⁺-Zellen eine maximale Fluoreszenz auf und bildeten eine klar abgrenzbare Population. Dagegen wurde nach zwölf Stunden eine höhere Frequenz zytokinbildender Zellen erreicht, wobei die Population dieser Zellen nicht mehr so gut abgrenzbar war. Die ebenfalls nach sechs Stunden ansteigende Frequenz CD69-exprimierender Zellen, die kein Zytokin exprimierten, spricht für eine unspezifische Stimulation von nicht-antigenspezifischen Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein verändertes Zytokinmilieu im Stimulationsansatz (Frentsch, DRFZ/AG Thiel, persönliche Mitteilung). Die hier gezeigte Kinetik der IFN γ -Sekretion nach Antigenstimulation stimmt im übrigen mit der von Nomura et al. durch intrazelluläre IFN γ -Färbung ermittelten Kinetik überein (Nomura et al., 2000).

Die Untersuchung des Zellverlustes während des Experimentes ergab, dass ca. 27% der ursprünglich vorhandenen Zellen in der Auswertung rückgewonnen wurden. Der Zellverlust lässt

sich durch die wiederholten Zentrifugationsschritte und Wechsel der Reaktionsgefäße erklären. Geht man davon aus, dass bei jedem Zentrifugationsschritt 10 bis 15% der Zellen verloren gehen, ist das Ergebnis plausibel.

5.3 Sensitivität der verwendeten Methoden

5.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die zu erwartenden Frequenzen autoreaktiver Zellen sind gering – sie bewegen sich in Höhe von ca. 10^{-4} bis 10^{-5} in PBMC (Eming et al., 2000). In der Durchflußzytometrie ist die Abgrenzung sehr kleiner Populationen von großen Populationen umso exakter möglich, je mehr Parameter zur Auftrennung verfügbar sind. In der eindimensionalen Darstellung eines Histogramms beispielsweise ist die Auftrennung gut möglich, solange die Merkmalsausprägungen „positiv“ und „negativ“ klar getrennt sind (Abb. 5-1 A) - bestehen dagegen fließende Übergänge, ist eine klare Abgrenzung nicht mehr möglich (Abb. 5-1 B). Stehen zwei Parameter zur Unterscheidung zweier Populationen zur Verfügung, ist die Auftrennung jedoch auch bei unscharfen Grenzen zwischen den Merkmalsausprägungen „positiv“ und „negativ“ möglich (Abb. 5-1 C bzw. D).

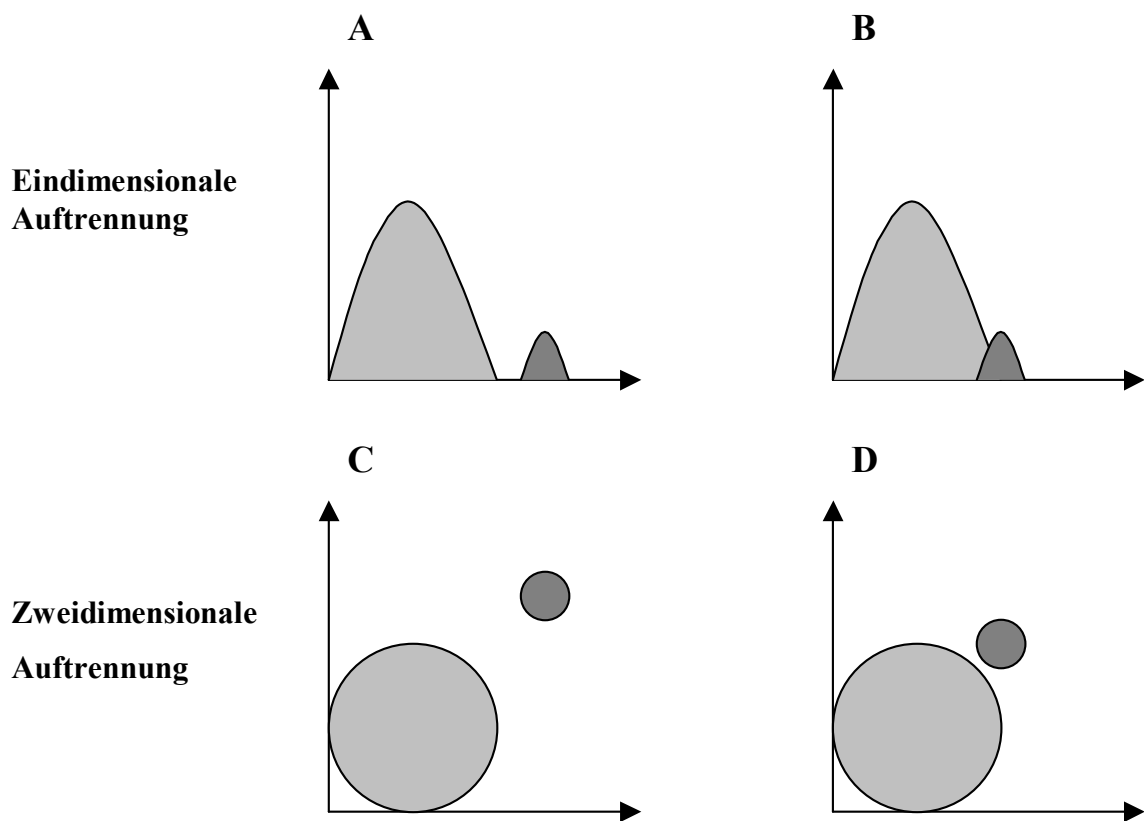


Abbildung 5-1: Die Abgrenzung sehr kleiner Populationen ist umso besser möglich, je mehr Parameter zur Verfügung stehen. Sie ist davon abhängig, wie scharf die Merkmalsausprägungen "positiv" (dunkelgrau) und "negativ" (hellgrau) voneinander trennbar sind. Sind diese klar abgrenzbar, ist eine ein- (A) und auch eine zwei- (C) dimensionale Auftrennung möglich. Gibt es jedoch fließende Übergänge, läßt sich mit Hilfe von zwei Parametern eine kleine Population abgrenzen (D), die in der einparametrischen Auftrennung teilweise in der großen Population verschwindet (B).

Um die zu detektierende Population der antigenspezifischen zytokinexprimierenden Zellen besser abgrenzen zu können, wurde zusätzlich zur Zytokinfärbung der Aktivierungsmarker CD69 auf der Zelloberfläche angefärbt. So wurde eine zweidimensionale Auftrennung erreicht. Beim Sekretionsassay stellt die anschließende magnetische Anreicherung sogar eine dritte Dimension zur Abgrenzung der kleinen antigenspezifischen Population von der großen nicht-spezifischen Population dar. Dies ist der theoretische Hintergrund für eine Erhöhung der Sensitivität, die auch experimentell mittels einer Verdünnungsreihe nachgewiesen wurde.

5.3.2 Bestimmung der Sensitivität mit Hilfe einer Verdünnungsreihe

Die Sensitivität der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen mittels intrazellulärer Färbung liegt bei ca. 1×10^{-4} in PBMC.

Um mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung nach Antigenstimulation spezifische T-Helferzellen nachweisen zu können, müssen diese von der unstimulierten Negativkontrolle abgrenzbar sein. Mehrfachmessungen dieser Negativkontrolle bei zwei verschiedenen gesunden Spendern zeigten sehr hohe Variabilitätskoeffizienten von fast 100%. Diese hohe relative Schwankung ist durch die Nähe der Messwerte zum Nullpunkt zu erklären. Die absolute Schwankung betrug bei wiederholt durchgeführten Messreihen jedoch immer weniger als 0,02% in $CD4^+$ -Zellen. Dieser Wert wurde deshalb als „Cut-off point“ definiert: Nur solche Proben wurden als Nachweis antigenspezifischer Zellen bewertet, bei denen die Frequenz zytokinexprimierender Zellen um mindestens 0,02% in $CD4^+$ -Zellen höher lag als in der Negativkontrolle. Bei einer Mindestzellzahl von 100 000 analysierten $CD4^+$ -Zellen besteht eine antigenspezifische Population somit aus mindestens 20 Zellen, die sich von 0 Zellen in der Negativkontrolle abheben. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde schließlich für die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen eine Sensitivität von 1×10^{-4} in PBMC bestimmt.

Die Sensitivität des IFN γ -Sekretionsassays ist abhängig von der Frequenz IFN γ -exprimierender Zellen in der Negativkontrolle und beträgt ca. 2×10^{-5} in PBMC.

Die Sensitivität des IFN γ -Sekretionsassays ist in erster Linie abhängig von der Frequenz IFN $\gamma^+CD69^+CD4^+$ -Zellen, die in der Negativkontrolle angereichert wurden und von denen sich eine antigenspezifische Population per definitionem durch einen Stimulationsindex größer drei abheben muss. Um unspezifische Stimulation *in vitro* weitestgehend auszuschließen, wurden alle Schritte des Experimentes vor der Sekretionsphase ohne Fremdproteine durchgeführt. Monozyten und tote Zellen werden bei der magnetischen Zellseparation unspezifisch angereichert. Deshalb wurden sie durch Anfärbung von CD14 bzw. Propidiumjodid (PI) aus der Analyse ausgegrenzt. Bei allen untersuchten Patienten und gesunden Probanden fanden sich in den Negativkontrollen Frequenzen IFN γ -sezernierender $CD69^+CD4^+$ -Zellen von $4,49 \times 10^{-7}$ bis $8,32 \times 10^{-6}$ in PBMC mit einem arithmetischen Mittelwert von $4,82 \times 10^{-6}$. In diese Frequenzen ist die Rückgewinnungsrate von 27% bereits eingerechnet, sie stehen im Einklang mit Angaben von Brosterhus et al., 1999. Die durch die Verdünnungsreihe ermittelte Sensitivität von ca. 2×10^{-5} entspricht ungefähr dem dreifachen der mittleren Hintergrundaktivierung – d.h. der per definitionem geringsten Frequenz, die gerade detektierbar ist. Da sie von der jeweiligen

Zytokinsekretion der unstimulierten Negativkontrolle abhängt, ist diese Sensitivität spenderabhängig. Eine variierende Zytokin- und CD69-Expression unstimulierter Zellen wurde im übrigen auch bei Verwendung der intrazellulären Zytokinfärbung gefunden (Sun et al., 1998).

Der Nachweis sehr seltener Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellseparation wurde bereits in einem anderen Kontext eingesetzt: zur Detektion von Tumorzellen im peripheren Blut von Krebspatienten (Martin et al., 1998). In diesem Zusammenhang gab es keine falsch positiven Ereignisse, d.h. Zellen, die das gesuchte Antigen exprimierten, aber keine Krebszellen waren. Die Sensitivität betrug für diese Methode 1×10^{-6} bis 1×10^{-8} . Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Sensitivität des IFN γ -Sekretionsassays nicht durch die Technik der magnetischen Anreicherung limitiert ist, sondern tatsächlich durch die IFN γ -Sekretion von CD4 $^{+}$ -Zellen in der Negativkontrolle begrenzt wird.

5.4 Das Autoantigen MBP kann von APC des peripheren Blutes aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden.

Bei der *in vitro* Stimulation von T-Helferzellen macht man sich zunutze, dass von außen zugegebenes Antigen von antigenpräsentierenden Zellen des peripheren Blutes aufgenommen, prozessiert und in MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird. Ob dies auch für das Autoantigen MBP zutrifft, sollte hier untersucht werden.

Es wurde zunächst gezeigt, dass ausschließlich Monozyten, die Makrophagen des peripheren Blutes, nach zwei Stunden Inkubation mit FITC-markiertem MBP eine erhöhte Fluoreszenz aufwiesen. Dies zeigt die Aufnahme von MBP durch Monozyten. Im weiteren Verlauf wurde auch die Prozessierung und Präsentation von MBP durch APC des peripheren Blutes gezeigt: Zellen einer MBP-spezifischen CD4 $^{+}$ -Zelllinie einer gesunden Spenderin wurden mit MBP restimuliert. Als antigenpräsentierende Zellen wurden autologe fluoreszenzmarkierte PBMC zugegeben und nach sechsstündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Reaktive IFN γ -Sekretion der MBP-spezifischen Zellen wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung nachgewiesen. Nur nach Inkubation der T-Zelllinie in Gegenwart von sowohl PBMC als auch dem Antigen exprimierten MBP-spezifische Zellen IFN γ . Dies zeigt, dass MBP von Zellen des peripheren Blutes aufgenommen und präsentiert wird und dieser Stimulus ausreicht, um innerhalb von sechs Stunden die Expression von IFN γ in einer T-Zelllinie zu induzieren.

5.5 Analyse IFN γ - und TNF α -exprimierender T-Helferzellen nach Stimulation mit einem Impf- und einem viralen Kontrollantigen

Es wurden Vollblutproben von insgesamt 34 MS-Patienten und 25 gesunden Kontrollpersonen mittels der intrazellulären Zytokinfärbung auf das Vorhandensein antigenspezifischer Th1-Zellen untersucht. Nach Stimulation mit Tetanus Toxoid (TT) bzw. Cytomegalie Virus Antigen (CMV) wurde die reaktive Expression von IFN γ bzw. TNF α in T-Helferzellen nachgewiesen. TT und CMV sind sogenannte „Recall-Antigene“, d.h. Antigene, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das Immunsystem der untersuchten Probanden mehrmals stimuliert haben. Man kann also davon ausgehen, dass bei einem großen Teil der untersuchten Personen T-Gedächtniszellen gegen diese Antigene vorliegen. Deshalb wurden sie in dieser Arbeit als Kontrollantigene eingesetzt, um die Fähigkeit der reaktiven Zytokinexpression von T-Helferzellen des peripheren Blutes zwischen MS-Patienten und Gesunden zu vergleichen.

5.5.1 Die T-Helferzellantwort auf die Antigene TT und CMV unterscheidet sich nicht zwischen MS-Patienten und Gesunden.

Sowohl der prozentuale Anteil der Personen, bei denen antigenspezifische Zellen nachweisbar waren, als auch die Frequenzen antigenspezifischer T-Helferzellen wiesen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Patienten und Gesunden auf. TT-reaktive T-Helferzellen zeigten 96% der gesunden Spender und 82% der MS-Patienten. Diese Differenz war statistisch nicht signifikant. Der hohe prozentuale Anteil der Probanden, bei denen TT-spezifische Zellen nachgewiesen werden konnten, ist in Anbetracht der empfohlenen Schutzimpfung nicht erstaunlich. Die detektierten Frequenzen TT-spezifischer CD4⁺-Zellen stehen in Einklang mit Frequenzangaben aus der Literatur, die durch den Nachweis reaktiver IFN γ -Expression in einem Enzym-Immunoassay (ELISPOT-Assay) ermittelt wurden (Helms et al., 2000). Auch die Antwort auf Stimulation mit CMV zeigte keine statistischen Unterschiede: Bei 52% der MS-Patienten und 46% der Gesunden konnten CMV-spezifische CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden. Dies entspricht Literaturangaben der CMV-Durchseuchungsrate (Brooks et al., 2001). Die ermittelten Frequenzen CMV-spezifischer T-Helferzellen konnten die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe (Waldrop et al., 1997) bestätigen.

5.5.2 Klinische Untergruppen der MS-Patienten weisen tendenzielle Unterschiede in der antigenspezifischen T-Helferzellantwort auf.

Bei Patienten mit chronischen MS-Formen (SPMS, n=3 bzw. PPMS, n=2) wurden geringere Frequenzen TT-reaktiver T-Helferzellen nachgewiesen als bei RRMS-Patienten bzw. Gesunden.

Wegen der geringen Fallzahlen muss dieses Ergebnis mit Vorsicht bewertet werden. Auffällig ist außerdem, dass die Patienten mit SPMS bzw. PPMS durchschnittlich 10 bis 13 Jahre älter waren als die RRMS-Patienten bzw. Gesunden. Somit ist denkbar, dass dieser Altersunterschied hinsichtlich der Impfungsrate eine Rolle spielt. Des weiteren ist es möglich, dass Befürchtungen impfasoziiierter Exazerbationen dazu führen, dass bei MS-Patienten Impfungen weniger häufig durchgeführt wurden, obwohl dies nicht den aktuellen Therapieempfehlungen entspricht (Zipp et al., 2001).

MS-Patienten mit immunsuppressiver Therapie (n=5) zeigten eine statistisch signifikante Verminderung der Frequenz TT-spezifischer T-Helferzellen gegenüber Gesunden. Die Frequenz CMV-spezifischer Zellen unterschied sich hingegen nicht. Aufgrund der geringen Fallzahl ist es schwierig, Aussagen über mögliche kausale Zusammenhänge zu machen. Es ist jedoch auch hier auffällig, dass drei von fünf immunsupprimierten Patienten chronisch progrediente Verlaufsformen aufwiesen und durchschnittlich älter waren als Gesunde bzw. MS-Patienten mit anderen Medikationen. Es wäre also denkbar, dass die geringere TT-Antwort ein Epiphänomen darstellt und der eigentliche Grund dafür die niedrigere Impfungsrate der immunsupprimierten Patienten ist. Dies erscheint insbesondere plausibel, da sich die CMV-spezifische T-Helferzellantwort nicht von der bei Gesunden unterscheidet.

MS-Patienten im Schub zeigten eine statistische Tendenz zu erhöhten Frequenzen CMV-spezifischer T-Helferzellen im Vergleich zu Patienten in klinischer Remission. Obwohl verschiedene virale Erkrankungen als Kofaktoren oder Auslöser für MS-Schübe diskutiert werden (Sibley et al., 1985), konnte bisher kein Zusammenhang zwischen der CMV-Seroreaktivität und der Krankheitsaktivität MS-Kranker nachgewiesen werden (Simmons, 2001; Myhr et al., 1998).

5.6 MBP-spezifische Th1-Zellen lassen sich im peripheren Blut nicht oder nur in sehr geringen Frequenzen nachweisen.

Bei keiner der untersuchten Blutproben von 33 MS-Patienten und 25 gesunden Kontrollpersonen waren mittels der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen MBP-spezifische Zellen nachweisbar. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine unzureichende Sensitivität der Methode. Dies würde bedeuten, dass MBP-spezifische T-Helferzellen in einer geringeren Frequenz als 1×10^{-4} im peripheren Blut vorliegen. Im weiteren Verlauf wurde Blut

von acht MS-Patienten mit dem sensitiveren IFN γ -Sekretionsassay auf MBP-spezifische Zellen untersucht, parallel wurden intrazelluläre Zytokinfärbungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde bei denjenigen Patienten, bei denen aus früheren Analysen antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen das Vorhandensein TT-reaktiver Zellen bekannt war, eine Probe mit TT stimuliert. Die Frequenzen TT-reaktiver CD4⁺-Zellen der intrazellulären IFN γ -Färbungen stimmten mit den nach dem IFN γ -Sekretionsassay rückgerechneten Frequenzen überein, was die Korrelation der Ergebnisse der beiden Methoden verdeutlicht. Bei einer Patientin konnten mit dem IFN γ -Sekretionsassay MBP-spezifische Zellen gezeigt werden. Der Stimulationsindex betrug 4,35 und die rückgerechnete Frequenz der MBP-spezifischen CD4⁺-Zellen in PBMC lag mit $2,15 \times 10^{-5}$ nahe an der Sensitivitätsgrenze. Bei den anderen untersuchten Patienten waren keine MBP-spezifischen Zellen nachweisbar.

Es ist wahrscheinlich, dass die Frequenzen autoreaktiver Zellen interindividuell eine ebenso hohe Schwankungsbreite zeigen wie die Frequenzen TT- oder CMV-spezifischer Zellen. Es ist dann denkbar, dass die Frequenzen bei den meisten Patienten unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen und auch des IFN γ -Sekretionsassays liegen, während bei einigen Patienten, so bei der hier gezeigten Patientin, MBP-spezifische Zellen in höheren Frequenzen vorliegen und damit nachweisbar sind.

Bisherige Literaturangaben über die Frequenzen MBP-spezifischer CD4⁺-Zellen beziehen sich vorwiegend auf die Berechnung von Vorläuferfrequenzen aus Limiting Dilution Assays (LDA), d.h. einer Methode, die Proliferation als antigenspezifische T-Zellantwort nachweist (Lodge et al., 1996; Lovett-Racke et al., 1998; Muraro et al., 2000; Tejada-Simon et al., 2000). Die so ermittelten Häufigkeiten sind sehr unterschiedlich, durchschnittlich belaufen sie sich auf Werte im Bereich 10^{-7} bis 10^{-5} . Daneben gibt es Frequenzberechnungen aus Enzym-Immunoassays (ELISPOT-Assays), die Antigenspezifität anhand reaktiver Zytokinsekretion nach 20 bis 48 Stunden nachwiesen (Söderström et al., 1994; McCutcheon et al., 1997; Hellings et al., 2001). Diese Untersuchungen kamen zu Ergebnissen im Bereich 3 bis $9,5 \times 10^{-5}$. Die einzige *ex vivo* Detektion MBP-spezifischer T-Zellen erfolgte indirekt über den Nachweis TCR-kodierender mRNA und zeigte Frequenzen von 4×10^{-4} bis 3×10^{-3} (Bieganowska et al., 1997). Es wurde mRNA nachgewiesen, die bestimmte TCR α - und TCR β -Ketten kodierte, die zuvor bei MBP-spezifischen T-Zellklonen derselben Patienten gefunden worden waren. Diese Frequenzen sind

jedoch nicht repräsentativ, da nur zwei MS-Patienten untersucht wurden, die aufgrund einer hohen Frequenz MBP-reaktiver Zellen im LDA vorselektiert worden waren.

Verschiedene Methoden weisen oft sehr unterschiedliche Frequenzen antigenspezifischer Zellen nach. Es ist mehrfach gezeigt worden, dass Methoden, die auf der Proliferation antigenspezifischer Zellen beruhen, geringere Frequenzen spezifischer Zellen aufzeigen als der direkte *ex vivo* Nachweis dieser Zellen (Kuzushima et al., 1999; Tan et al., 1999). Eine plausible Erklärung dafür ist der programmierte Zelltod (Apoptose), der auch in reifen T-Zellen durch Stimulation induziert werden kann (Wesselborg et al., 1993; Russell, 1995). Dieser Mechanismus wurde auch an MBP-spezifischen T-Zelllinien von MS-Patienten und Gesunden gezeigt (Pelfrey et al., 1995). Das Ergebnis des direkten *ex vivo* Nachweises antigenspezifischer T-Zellen wird von apoptotischem Zelltod nicht beeinflusst.

Es wäre möglich, dass sich autoreaktive T-Zellen des peripheren Blutes in einem anergen Zustand befinden, der eine Induktion der Zytokinexpression nicht zulässt. Diese MBP-spezifischen Zellen ließen sich mit der Tetramerfärbung nachweisen. Diese wäre allerdings in Anbetracht der Vielfalt der in Frage kommenden HLA-Typen sowie mehrerer immundominanter Peptide äußerst aufwendig. Die MHC-Klasse-II-Tetramerfärbung ist noch in Entwicklung und kann noch nicht standardmäßig für solche Untersuchungen eingesetzt werden.

5.7 Auch im Liquor von MS-Patienten sind keine MBP-spezifischen Th1-Zellen nachweisbar.

Frühere Publikationen haben gezeigt, dass die Frequenz myelinspezifischer T-Helferzellen im Liquor von MS-Patienten ca. 100fach höher ist als im peripheren Blut (Olsson et al. (2), 1990; Söderström et al., 1994). Dies gilt neben MBP auch für andere Myelinantigene und erscheint plausibel – ist doch das ZNS der Ort des Geschehens dieser neurologischen Erkrankung. Liquoruntersuchungen spielen in der Erstdiagnostik der MS zum Nachweis intrathekalen IgG-Synthese eine entscheidende Rolle, im weiteren Verlauf der Erkrankung haben sie jedoch keine Bedeutung mehr. Bei Patienten, deren Liquorproben untersucht werden können, handelt es sich also vornehmlich um Patienten mit kurzer Krankheitsdauer. Diese zeitliche Nähe zum Krankheitsausbruch macht es wahrscheinlich, die pathogenetisch verantwortlichen Faktoren tatsächlich nachweisen zu können. Des weiteren nehmen die meisten der Patienten in diesem Stadium noch keine Medikamente, was die Aussagekraft immunologischer Experimente erhöht.

Für diese Arbeit konnten nur drei MS-Patienten untersucht werden. Dementsprechend können aus den Ergebnissen keine definitiven Aussagen geschlossen werden. Sie können nur Hinweise dafür geben, ob und wie weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinen. Bei keinem der drei MS-Patienten wurden IFN γ -exprimierende Zellen nach MBP-Stimulation detektiert. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen in einer Frequenz vorliegen, die unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt. Die bei der MS nur mäßig erhöhte Zellzahl im Liquor und die nur sehr begrenzte Verfügbarkeit des Liquors führt dazu, dass insgesamt nur geringe Zellzahlen zur Untersuchung erhältlich sind. Pro Ansatz konnten zwischen $3,7 \times 10^3$ und 5×10^4 CD4 $^+$ -Zellen untersucht werden. Definiert man auch hier eine Zellzahl von 20 als Mindestgröße einer Population und geht von einer Rückgewinnungsrate von ca. 50% (Hochrechnung aus je 90% Rückgewinnungsrate bei insgesamt sechs Zentrifugationsschritten) aus, so läge die Detektionsgrenze bei 1×10^{-2} bis 8×10^{-4} . Bei einer anderen organspezifischen Autoimmunerkrankung, der Reaktiven Arthritis, wurden in der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke mittels Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen bakterienspezifische T-Helferzellen in Frequenzen von ca. 1-2% in CD4 $^+$ -Zellen nachgewiesen. Auch bei dieser Erkrankung fanden sich im betroffenen Organ, dem Gelenk, bis zu 30% höhere Frequenzen antigenspezifischer Zellen im Vergleich zu peripherem Blut (Thiel et al., 2000). Lägen bei der MS ähnliche Frequenzen autoantigenspezifischer CD4 $^+$ -Zellen im Liquor vor, so wären sie mit der hier beschriebenen Methode nachweisbar. Es bleibt allerdings zu betonen, dass der Liquor selbst nicht das betroffene Organ darstellt, sondern das ZNS nur umgibt und es somit möglich wäre, dass pathogenetisch relevante Zellen nur im ZNS selbst in höheren Frequenzen zu finden sind. Nach SEB-Stimulation konnten bei allen Patienten Populationen IFN γ -exprimierender Zellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass Liquorzellen, vergleichbar mit Zellen des peripheren Blutes, durch *in vitro* Kurzzeitstimulation zur Zytokinexpression aktivierbar sind – zumindest durch ein bakterielles Superantigen, das T-Zellen polyklonal durch Quervernetzung von TCR und MHC-Molekülen aktiviert. Es ist jedoch nicht bewiesen, dass diese Stimulation auch via Erkennung von Peptiden in Assoziation mit MHC-Molekülen möglich ist. Hierzu müssten zytokinexprimierende Liquorzellen nach Zugabe eines konventionellen Antigens, dessen Peptide in MHC-Molekülen präsentiert werden, nachgewiesen werden. Die auffällig höheren Frequenzen SEB-reaktiver CD4 $^+$ -Zellen im Liquor im Vergleich zu PBMC lassen sich durch das selektive Übertreten der Blut-Hirn-Schranke durch aktivierte Lymphozyten und die dadurch unterschiedliche Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation in Liquor und peripherem Blut erklären: Der prozentuale Anteil der Gedächtniszellen an CD4 $^+$ -

Zellen ist im Liquor sowohl bei MS-Patienten als auch bei Gesunden mit ca. 90% fast doppelt so hoch wie im peripheren Blut (Vrethem et al., 1998).

Um wirkliche Aussagen über das Vorhandensein bzw. die Frequenz MBP-spezifischer T-Helferzellen im Liquor von MS-Patienten machen zu können, ist es nötig, eine größere Anzahl von Liquorproben zu untersuchen.

5.8 Ausblick

Die Pathogenese der MS ist trotz intensiver Forschung ungeklärt. Neben der in Frage kommenden Myelinantigene gibt es eine Vielzahl anderer im ZNS MS-Kranker exprimierter Moleküle, die als Autoantigene in Frage kommen. Die ausgeprägte interindividuelle Heterogenität histopathologischer und auch klinischer Merkmale der Erkrankung deuten auf eventuell verschiedenartige zugrunde liegende Pathomechanismen hin. So wäre es möglich, dass für ein bestimmtes Autoantigen spezifische Zellen nur zu einem gewissen Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielen. Es konnte zum Beispiel der histopathologische Nachweis autoreaktiver Zellen gegen verschiedene Antigene mit dem Alter der MS-Läsionen korreliert werden (Lucchinetti CF et al., 1996). In den letzten Jahren haben sich neue Möglichkeiten zur direkten *ex vivo* Detektion niederfrequenter antigenspezifischer Zellen entwickelt. Ein möglicher Ansatz, unbefangene neue Technologien einzusetzen, wäre der Versuch der Detektion autoreaktiver T-Zellen ohne Vorselektion der in Frage kommenden Autoantigene. Es erscheint sinnvoll, sich nicht auf die in der Literatur bekannten potentiellen Autoantigene zu beschränken, sondern mit neuen Methoden noch einmal einen Schritt weiter vorn zu beginnen: bei der Stimulation von T-Zellen aus peripherem Blut bzw. Liquor cerebrospinalis mit humanem ZNS-Homogenat oder Homogenat aus MS-Läsionen.

Die hier verwendeten Methoden zeichnen sich durch eine einfache Durchführung, gute Reproduzierbarkeit und Spezifität aus. Sie haben eine Sensitivität von bis zu 2×10^{-5} in PBMC gezeigt. Die klinische Bedeutung der Detektion MBP-spezifischer T-Helferzellen bei MS-Patienten liegt in der möglichen Anwendung in Diagnostik und Therapie: Seit langer Zeit wird nach einem Marker der Krankheitsaktivität gesucht, der gesundheitsökonomischen Ansprüchen genügt - das heißt, der zuverlässig, einfach und nicht zu kostenaufwendig bestimmbar ist. Daneben bietet die Isolierung MBP-spezifischer T-Helferzellen und deren *in vitro* Manipulation die Möglichkeit zur antigenspezifischen Therapie. So kann die Impfung mit autologen bestrahlten MBP-reaktiven T-

Zellen zur selektiven Eliminierung dieser spezifischen Population im peripheren Blut führen (Zhang et al., 2002). Als Wirkmechanismus dieser sogenannten T-Zell-Vakzination wird eine Erkennung spezifischer TCR-Sequenzen durch zytotoxische CD8⁺-Zellen angenommen. Ein anderer therapeutischer Ansatz stützt sich auf die Hypothese, dass ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen zur Entstehung der MS führt (vgl. Kap.1.1.3). Nach der Isolierung pathogenetisch verantwortlicher, autoreaktiver Th1-Zellen könnte man *in vitro* deren Zytokinprofil modulieren und die Expression antiinflammatorischer bzw. regulatorischer Zytokine induzieren. Nach adoptivem Zelltransfer könnten sie dann durch ihre Antigenspezifität direkt am Ort des Geschehens protektiv wirken.

Auf der Suche nach einem Marker der Krankheitsaktivität scheinen die hier verwendeten Methoden zunächst nicht geeignet, da die Frequenz MBP-spezifischer T-Helferzellen bei den meisten geringer als 2×10^{-5} in PBMC zu sein scheint. Es ist jedoch möglich, dass für ein anderes Autoantigen spezifische T-Zellen in höheren Frequenzen vorliegen. Es bliebe dann weiterhin zu klären, ob die Frequenz solcher Zellen mit der Krankheitsaktivität korreliert oder ob ein anderes Merkmal dieser Zellen erfasst werden kann, das den Verlauf der Erkrankung widerspiegelt.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche Entmarkungserkrankung des Zentralnervensystems und wird zu den T-zellvermittelten Autoimmunerkrankungen gezählt. Als Autoantigene werden sowohl Myelinkomponenten wie Myelin Basic Protein (MBP), aber auch Nicht-Myelinantigene wie zum Beispiel Hitzeschockproteine diskutiert.

In dieser Arbeit wurden Methoden zum direkten Nachweis autoreaktiver proinflammatorischer T-Helferzellen etabliert. Während bisher zum Nachweis autoantigenspezifischer T-Zellen deren Kultur über Tage bis Monate unumgänglich war, wurden hier MBP-reaktive T-Zellen anhand der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor α nach Kurzzeitstimulation direkt *ex vivo* nachgewiesen. Zunächst wurde die Analyse antigenreaktiver Zytokinexpression in fixierten Zellen optimiert, die eine Sensitivität von 1×10^{-4} in PBMC zeigte. Die T-Helferzellantwort in peripherem Blut von 34 untersuchten MS-Patienten auf ein Impf- und ein virales Kontrollantigen unterschied sich nicht wesentlich von der gesunder Kontrollpersonen (n=25). Es konnten bei keiner der untersuchten Personen MBP-reaktive T-Helferzellen detektiert werden. Anschließend wurde reaktiv sezerniertes Zytokin extrazellulär gebunden und so auf der Oberfläche lebender antigenspezifischer Zellen nachgewiesen. Die Sensitivität dieser Methode konnte durch einen anschließenden magnetischen Anreicherungsschritt auf 2×10^{-5} erhöht werden. Bei einem von acht MS-Patienten wurde so eine Population MBP-spezifischer Zellen mit einer Ausgangsfrequenz von $2,15 \times 10^{-5}$ nachgewiesen. Im Liquor von drei MS-Patienten ließen sich keine MBP-reaktiven Th1-Zellen detektieren – für eine aussagekräftige Bilanz sind jedoch höhere Fallzahlen notwendig. Der in dieser Arbeit etablierte Versuchsaufbau wird zur Analyse weiterer Liquorproben bereits verwendet.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Frequenz MBP-spezifischer Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Probanden sehr gering ist und sich bei den meisten Patienten in einem Bereich kleiner als 2×10^{-5} in PBMC bewegt. Es wäre jedoch auch denkbar, dass höherfrequente Zellen sich in einem anergen Zustand befinden und nicht durch eine Kurzzeitstimulation zur Zytokinexpression stimulierbar sind.

Literaturverzeichnis

Lehrbücher und Nachschlagewerke:

Baenkler H: Medizinische Immunologie - Grundlagen, Diagnostik, Klinik, Therapie, Prophylaxe, Sonderbereiche.
ecomed, Landsberg 1995.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 22. Auflage.
Appleton & Lange, Stamford 2001.

Burmester GR, Pezzutto A: Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik.
Thieme Verlag, Stuttgart 1998.

Janeway CA, Travers P: Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, 5. Auflage.
Garland Press, New York 2001.

Peter HH, Pichler WJ: Klinische Immunologie, 2. Auflage.
Urban & Schwarzenberg, München 1996.

Radbruch A: Flow Cytometry and Cell sorting, 2. Auflage.
Springer Verlag, Heidelberg 2000.

Artikel aus Fachzeitschriften:

Abbas AK et al.: Functional diversity of helper T lymphocytes.
Nature 1996; 383: 787-793.

Allegretta M et al.: T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis.
Science 1990; 247: 718-21.

Alter M et al.: Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel.
Archives of Neurology 1966; 15: 234-7.

Altman JD et al.: Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.
Science 1996; 274: 94-6.

Becher B et al.: Interferon- γ secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: Correlation with disease phase and Interferon- β therapy.
Annals of Neurology 1999; 45: 247-50.

Beck J et al.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations?
Acta Neurologica Scandinavica 1988; 78: 318-23.

Ben-Nun A et al.: Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein.
Nature 1981; 292(5818): 60-1.

Bernard CCA et al.: Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis.
Journal of Molecular Medicine 1997; 75: 77-88.

Bieganowska KD et al.: Direct Ex Vivo Analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease.
Journal of Experimental Medicine 1997; 185(9): 1585-94.

Bielekova B et al.: Preferential expansion of autoreactive T lymphocytes from the memory T-cell pool by IL-7.
Journal of Neuroimmunology 1999; 100: 115-23.

Bielekova B et al.: Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand.
Nature Medicine 2000; 6(10): 1167-75.

Brosterhus H et al.: Enrichment and detection of live antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on cytokine secretion.
European Journal of Immunology 1999; 29: 4053-9.

Burns J et al.: Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis.
Annals of Neurology 1999; 45: 33-9.

Chou YK et al.: Frequency of T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.

Journal of Neuroimmunology 1992; 38: 105-14.

Comabella M et al.: Elevated Interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy.

Journal of Clinical Investigation 1998; 102: 671-8.

Dore-Duffy P et al.: Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis.

Advances in Experimental Medicine and Biology 1993; 331: 243-8.

Durán I et al.: Similar pro- and anti-inflammatory cytokine production in the different clinical forms of multiple sclerosis.

Multiple Sclerosis 2001; 7: 151-6.

Ebers GC et al.: The role of genetic factors of multiple sclerosis susceptibility.

Journal of Neuroimmunology 1994; 54: 1-17.

Eming R et al.: Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay.

British Journal of Dermatology 2000; 143: 1279-82.

Eylar, EH: Encephalitogenic basic protein (EBP).

Neurosciences Research Program Bulletin 1971; 9: 545-6.

Gran B et al.: Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate.

Neurology 2000; 55: 1704-14.

Hellings N et al.: T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls.

Journal of Neuroscience Research 2001; 63: 290-302.

Helms T et al.: Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients.

Journal of Immunology 2000; 164: 3723-32.

Hofman FM et al.: Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain.
Journal of Experimental Medicine 1989; 170: 607-12.

Hohlfeld R et al.: The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis.
Neurology 1995; 45(Suppl 6): 33-38.

Kappos L et al.: Induction of a non-encephalogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomised phase II trial.
Nature Medicine 2000; 6(10): 1176-82.

Kelso A: Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?
Immunology Today 1995; 16(8): 374-9.

Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS).
Neurology 1983; 33: 1444-1452.

Kuzushima K et al.: Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T-cell frequencies by flow cytometry.
Blood 1999; 94(9): 3094-100.

Lassmann H et al.: Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions?
Springer Seminars in Immunopathology 1995; 17: 77-87.

Link H et al.: Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.
Journal of Neuroimmunology 1992; 38: 63-74.

Lodge PA et al.: Frequency of MBP and MBP peptide-reactive T cells in the HPRT mutant T-cell population of MS patients.
Neurology 1996; 46: 1410-5.

Lovett-Racke AE et al.: Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients.
Journal of Clinical Investigation 1998; 101: 725-30.

Lucchinetti CF et al.: Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis.

Brain Pathology 1996; 6: 259-74.

Lucchinetti CF et al.: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination.

Annals of Neurology 2000; 47: 707-17.

Ludwin SK: Understanding multiple sclerosis: Lessons from pathology.

Annals of Neurology 2000; 47: 691-3.

Maggi E et al.: Accumulation of Th-2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis.

Journal of Immunology 1991; 146(4): 1169-74.

Manz R et al.: Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995; 92: 1921-5.

Martin R et al.: T helper cell differentiation in multiple sclerosis and autoimmunity.

Immunology Today, 1998; 19(11): 495-98.

Martin VM et al.: Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS.

Experimental Hematology 1998; 26(3): 252-64.

Martino G et al.: Immunopathogenesis of multiple sclerosis: The role of T cells.

Opinions in Neurology 1999; 12: 309-21.

McCutcheon M et al.: A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes.

Journal of Immunological Methods 1997; 210: 149-66.

Miller DM et al.: A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations.

Multiple Sclerosis 2000; 6: 267-73.

Miltenyi S et al.: High gradient cell sorting with MACS.
Cytometry 1990; 11: 231-8.

Morahan G et al.: Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele.
Nature Genetics 2001; 27(2): 218-21.

Mosmann TR et al.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
Journal of Immunology 1986; 136(7): 2348-57.

Muraro P et al.: Human autoreactive CD4+ T cells from naïve CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity.
Journal of Immunology 2000; 164: 5474-81.

Myhr KM et al.: Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway.
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 1998; 64: 539-42.

Neuhaus O et al.: Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis.
Neurology 2001; 56: 702-8.

Nomura et al.: Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4+ T cells.
Cytometry 2000; 40: 60-68.

O'Shea JJ et al.: Cytokines and autoimmunity.
Nature Reviews Immunology 2002; 2: 37-45.

Olsson T et al.(1): Antimyelin basic protein and antimyelin antibody-producing cells in multiple sclerosis.
Annals of Neurology 1990; 27: 132-6.

Olsson T et al.(2): Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of Interferon- γ .
Journal of Clinical Investigation 1990; 86: 981-5.

Olsson T: Cerebrospinal Fluid.
Annals of Neurology 1994; 36: 100-102.

Palace J et al.: New treatments and azathioprine in multiple sclerosis.
Lancet 1997; 350(9073): 261.

Pelfrey CM et al.: Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of myelin basic protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from multiple sclerosis patients and normal individuals.
Journal of Immunology 1995; 154: 6191-202.

Petry KG et al.: Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analysing features of multiple sclerosis.
Pathologie Biologie 2000; 48: 47-53.

Pettinelli CB et al.: Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vivo activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes.
Journal of Immunology 1981; 127(4): 1420-3.

Poser CM et al.: New diagnostic criteria for multiple sclerosis : Guidelines for research protocols.
Annals of Neurology 1983; 13(3): 227-231.

Poser CM et al.: Diagnostic criteria for multiple sclerosis.
Clinical Neurology and Neurosurgery 2001; 103: 1-11.

Prussin C: Cytokine flow cytometry: Understanding cytokine biology at the single-cell level.
Journal of Clinical Investigation 1997; 17(3): 195-204.

Rohowsky-Kochan C et al.: Cytokine secretion profile of myelin basic protein-specific T cells in multiple sclerosis.
Multiple Sclerosis 2000; 6: 69-77.

Romagnani S: Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more.
Immunology Today 1991; 12(8): 256-7.

Russell JH: Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses.
Current Opinion in Immunology 1995; 7: 382-8.

Sadovnik AD et al.: A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update.
Annals of Neurology 1993; 33: 281-5.

Schmidt S: Candidate autoantigens in multiple sclerosis.
Multiple Sclerosis 1999; 5: 147-60.

Scholz C et al.: Expansion of autoreactive T cells in Multiple Sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation.
Journal of Immunology 1998; 160: 1532-8.

Sharief MK et al.: In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis.
Journal of Neuroimmunology 1992; 38: 27-34.

Sherrit et al.: Influence of HLA-DR2, HLA-DPw4, and T cell receptor α chain genes on the susceptibility to multiple sclerosis.
International Immunology 1992; 4(2): 177-81.

Sibley WA et al.: Clinical viral infections and multiple sclerosis.
Lancet 1985; 1: 1313-15.

Simmons A: Herpesviruses and multiple sclerosis.
Herpes 2001; 8(3): 60-3.

Singh VK et al.: The paradigm of Th1 and Th2 cytokines – Its relevance to autoimmunity and allergy.
Immunological Research 1999; 20: 147-61.

Söderström M et al.: Autoimmune T cell repertoire in optic neuritis and multiple sclerosis : T cells recognising multiple myelin proteins are accumulated in cerebrospinal fluid.
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 1994; 57(5): 544-51.

Stinissen P et al.: Myelin reactive T cells in the autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis.
Multiple Sclerosis 1998; 4: 203-211.

Sun JB et al.: T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls.
European Journal of Immunology 1991; 21: 1461-8.

Suni MA et al.: Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry.
Journal of Immunological Methods 1998; 212: 89-98.

Tan LC et al.: A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers.

Journal of Immunology 1999; 162: 1827-35.

Tejada-Simon MV et al.: Aberrant T cell responses to myelin antigens during clinical exacerbation in patients with multiple sclerosis.

International Immunology 2000; 12(12): 1641-50.

Tejada-Simon MV et al.: Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals.

European Journal of Immunology 2001; 31: 907-17.

The IFN β Multiple Sclerosis Study Group: Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. Clinical results of a multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. MRI analysis results of a multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.

Neurology 1993; 43: 655-667.

Thiel A et al.: Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry.

Arthritis and Rheumatism 2000; 43(12): 2834-42.

Traugott U: Multiple sclerosis: relevance of class I and class II MHC-expressing cells to lesion development.

Journal of Neuroimmunology 1987; 16(2): 283-302.

Van der Graaf WL et al.: Prognostic value of Th1/Th2 ratio in rheumatoid arthritis.

Lancet 1998; 351:1931.

Van Noort JM et al.: The small heat-shock protein α B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis.

Nature 1995; 375: 798-801.

Van Oosten BW et al.: Increased production of tumor necrosis factor α , and not interferon γ , preceding disease activity in patients with multiple sclerosis.

Archives of Neurology 1998; 55: 793-8.

Vandevyver C et al.: Cytokine mRNA profile of myelin basic protein reactive T-cell clones in patients with multiple sclerosis.

Autoimmunity 1998; 28: 77-89.

Vrethem M et al.: CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls.
Acta Neurologica Scandinavica 1998; 97: 215-20.

Waldrop SL et al.: Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry.
Journal of Clinical Investigation 1997; 99: 1739-50.

Waldrop SL et al.: Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis.
Journal of Immunology 1998; 161: 5284-95.

Weinshenker BG: Epidemiology of multiple sclerosis.
Neuroepidemiology 1996; 14(2): 291-308.

Wekerle H: Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease.
Current opinion in Neurobiology 1993; 3: 779-84.

Wekerle H et al.: Animal models.
Annals of Neurology 1994; 36: S47-S53.

Wesselborg S et al.: Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells.
Journal of Immunology 1993; 150: 4338-45.

Woodroffe MN et al.: Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: Detection by non-radioactive in situ hybridisation.
Cytokine 1993; 5(6): 583-8.

Yudkin PL et al.: Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis.
Lancet 1991; 338: 1051-55.

Zang Y et al.: Impaired apoptotic deletion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis.
European Journal of Immunology 1999; 29: 1692-1700.

Zelenika D et al.: A new family of transcripts of the myelin basic protein gene: expression in brain and in immune system.

Journal of Neurochemistry 1993; 60(4): 1574-7.

Zhang J et al.: Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: Precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity.

Annals of Neurology 1992; 32: 330-8.

Zhang JZ et al.: T-cell vaccination in multiple sclerosis: Results of a preliminary study.

Journal of Neurology 2002; 249: 212-18.

Zhang Y et al.: The T-lymphocyte response against myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis.

Neurology 1993; 43: 403-7.

Zipp F et al.: Aktuelle Empfehlungen zu Impfungen bei Multipler Sklerose.

Nervenarzt 2001; 72: 802-6.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei folgenden Personen:

Andreas Radbruch

für die häufigen feed-backs

Andreas Thiel

für die viele Zeit für Diskussionen

Frauke Zipp

als Kooperationspartner des Institutes für Neuroimmunologie

Jan Lünemann

für die logistische Koordination und klinische Unterstützung

Allen Mitgliedern der AG Thiel

für die Wissenschaft und das soziale Drumherum

Arne Sattler, Beate Möves, Diana Stauch, Frank Chen, Ilka Schulze, Martin Rothe, Meral Esen, Sandra Schneider, Siggi Kohler, Silke Nitsch, Sonja Kimmig, Tobias Alexander

insbesondere Arne für die Einarbeitung und Beate für die Weiterführung der Liquorexperimente

Frank Chen, Markus Odendahl, Miriam Podtschaske, Sergio Arce, Silke Nitsch

für viel Blut

Peihua Wu

für das Know-How zur Stimulation von T-Zelllinien

Alexander Scheffold, Desiree Kunkel, Frank Hardung, Maurus de la Rosa

für's Mitdenken an vielen kleinen Stellen

Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann, Tuula Geske, Frau Kiel

für die Bereitstellung alles Laboralltäglichen

Thoralf Kaiser, Katharina Raba

für Hilfe am FACS

Roland Lauster, Luzie Rainers-Schramm, Mark Rosowski

für molekularbiologische Unterstützung

Dörte Huscher, Frank Chen, Siggi Kohler

für statistischen Rat

Ulrike Frey, Christine Knaevelsrud, Miriam Podtschaske

für inhaltliche und sprachliche Korrekturen und mehr

Heidi, Bernd und Christopher Holzknecht

für alles

Hrafnkell Birgisson

für den nötigen Abstand zur Relativierung der wissenschaftlichen Hochs und Tiefs

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie einer anderen Arbeit dar und die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 29.Juli 2002